



TITLE:

免疫抑制剤による小腸ペプチド輸送体の機能・発現変動に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

本橋, 秀之

CITATION:

本橋, 秀之. 免疫抑制剤による小腸ペプチド輸送体の機能・発現変動に関する研究. 京都大学, 2001, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183323>

RIGHT:

免疫抑制剤による小腸ペプチド輸送体の
機能・発現変動に関する研究

2001

本 橋 秀 之

免疫抑制剤による小腸ペプチド輸送体の
機能・発現変動に関する研究

2001

本 橋 秀 之

目 次

総 論 の 部

緒 言	1
第Ⅰ章 ヒト由来培養腸上皮細胞Caco-2に発現するペプチド輸送体に及ぼす 免疫抑制剤の影響	3
第1節 Caco-2細胞におけるPEPT1の発現	3
第2節 PEPT1輸送活性に及ぼす免疫抑制剤の影響	5
第3節 免疫抑制剤によるPEPT1輸送活性の変動機構	9
考 察	12
第Ⅱ章 ラット小腸ペプチド輸送体に及ぼす免疫抑制剤投与の影響	16
第1節 免疫抑制剤投与による生理的パラメータの変動	16
第2節 免疫抑制剤投与によるPEPT1の活性変動	18
第3節 免疫抑制剤投与によるPEPT1の発現変動	20
考 察	23
第Ⅲ章 小腸移植ラットにおける小腸ペプチド輸送体の発現変動	27
第1節 移植小腸の組織学的検討	27
第2節 移植小腸におけるPEPT1の発現変動	28
考 察	32
結 論	35
謝 辞	38

実 験 の 部	39
第Ⅰ章 実験の部	39
第Ⅱ章 実験の部	44
第Ⅲ章 実験の部	46
論 文 目 録	49
引 用 文 献	50

総 論 の 部

緒 言

蛋白質、脂肪及び複合炭水化物は消化管において吸収可能な低分子物質まで分解され、小腸上皮の細胞膜に存在する輸送蛋白により経細胞的に吸収され血液やリンパ液中へ効率的に移行する¹⁾。経口摂取された食物中の蛋白質は、胃や膵臓の蛋白分解酵素によりアミノ酸や小分子ペプチドまで分解され、それぞれアミノ酸輸送系やペプチド輸送系により小腸管腔内から体内に吸収される²⁾。小腸上皮細胞にはこれら小分子ペプチドを輸送する H^+ /ペプチド共輸送体が存在すること、この輸送体は内向きの H^+ 勾配を駆動力としジ及びトリペプチドを輸送することが知られている。経口摂取された蛋白質の分解産物は小腸においてその大部分がペプチドの形として存在することなどから³⁻⁵⁾、 H^+ /ペプチド共輸送体が蛋白分解産物の主要な吸収経路として考えられている⁶⁾。1994年Feiらによりウサギ小腸より H^+ /ペプチド共輸送体PEPT1がクローニングされ⁷⁾、続いてヒト⁸⁾、ラット⁹⁾、マウス¹⁰⁾などでもPEPT1がクローニングされた。その後、種々の発現系を用いてその構造・機能特性について解析が進められている^{6, 11-15)}。

免疫抑制剤タクロリムス及びシクロスポリンは、移植医療において臓器生着率のめざましい上昇と患者生存率の向上をもたらした。しかしこれらの薬物は有効な免疫抑制能を有する一方で、副作用として中枢神経毒性や耐糖能の異常、腎障害、肝障害などが知られており^{16, 17)}、さらに消化管に対する副作用として下痢や嘔吐、栄養吸収不全を伴う体重減少なども報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。また実験動物を用いた検討などから、これら免疫抑制剤が小腸からのグルコース吸収を低下させるなど様々な小腸機能に影響を及ぼすことが示されてきた¹⁹⁻²²⁾。特にタクロリムスは小腸移植患者の術後管理にも用いられており^{23, 24)}、これらの免疫抑制剤が小腸機能に及ぼす影響を明らかにする必要があると考え

る。しかしながら、小腸栄養吸収機能を担う輸送体に及ぼすこれら免疫抑制剤の影響については不明な点が多く残されている。そこで著者は小腸ペプチド輸送体に及ぼすタクロリムス及びシクロスポリンの影響を明らかにすることを目的として、これら免疫抑制剤によるPEPT1の機能・発現変動について二章にわたり検討し、さらに第三章ではタクロリムスにより免疫反応を抑制した小腸移植ラットにおけるPEPT1の発現変動について検討を加えた。

以下、得られた結果について論述する。

第 I 章 ヒト由来培養腸上皮細胞Caco-2に発現するペプチド輸送体に及ぼす免疫抑制剤の影響

ヒト大腸ガン由来培養細胞Caco-2はdish上に培養すると分化し上皮細胞様の性質を示すことが知られている²⁵⁾。分化したCaco-2細胞には小腸に発現する輸送体が多く存在していることから、小腸上皮細胞のモデル系として繁用されている。またCaco-2細胞にはH⁺/ペプチド共輸送体が発現することから、小分子ペプチドやペプチド類似薬物の輸送及び活性制御機構の検討にも用いられてきた^{6, 11, 14, 26-30)}。さらに多孔性フィルター上にCaco-2細胞を培養することにより、経細胞輸送について検討を行うことも可能である^{26, 29, 30)}。本章では上皮細胞に発現するペプチド輸送体に及ぼすタクロリムス及びシクロスポリンの影響を明らかにするため、まずCaco-2におけるペプチド輸送活性がPEPT1によって媒介されていることを確認し、さらにこれら免疫抑制剤処理によるPEPT1輸送活性及び発現の変動について検討を行った。

第 1 節 Caco-2細胞におけるPEPT1の発現

Caco-2細胞にPEPT1が発現していることを確認するため、PEPT1の基質であるglycylsarcosineのpH依存的な取り込みについて検討した。Caco-2細胞へのglycylsarcosine取り込みは細胞外を酸性化することで顕著に増大し、ヒトPEPT1を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞へのglycylsarcosine取り込みと同様のpH依存性を示した (Fig. I-1)。またPEPT1に特異的なプローブを用いてノーザンブロット解析を行ったところ、約3.1 kbp付近にシグナルが観察された (Fig. I-2)。以上の結果からCaco-2細胞にPEPT1が発現し機能していることが判明した。

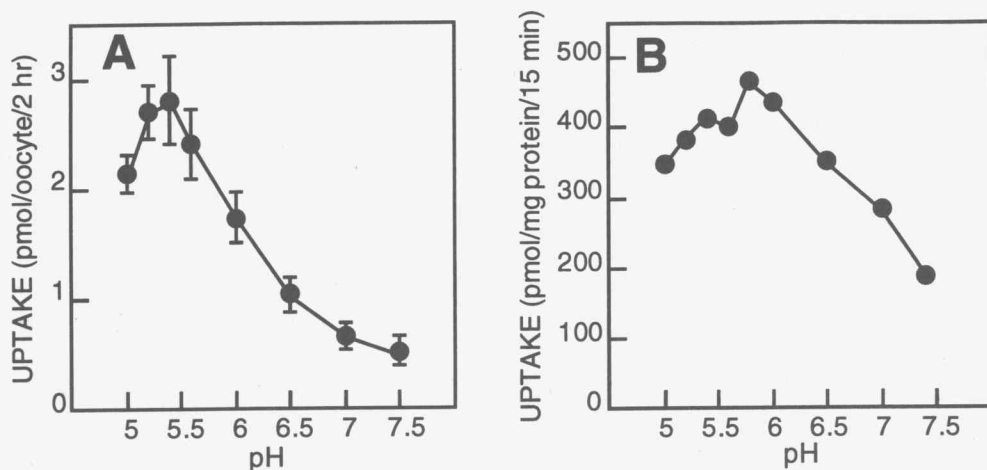


FIG. I-1. pH-dependence of [^{14}C]glycylsarcosine uptake by oocytes injected with *in vitro* transcribed hPEPT1 cRNA (A) or by Caco-2 cell monolayers (B). (A) Uptake by oocytes was assayed for 2 hr at 25°C in the presence of 20 μM [^{14}C]glycylsarcosine 24 hr after injection of 50 nl of hPEPT1 cRNA (5 ng). Each point represents the mean \pm S.E. of eight to twelve experiments. (B) Caco-2 monolayers were incubated for 15 min at 37°C with 2 ml of incubation medium containing 20 μM [^{14}C]glycylsarcosine. Thereafter, the monolayers were washed twice with 5 ml of ice-cold incubation medium (pH 7.4), and the cell-associated radioactivity was determined. Each point represents the mean \pm S.E. of three monolayers.

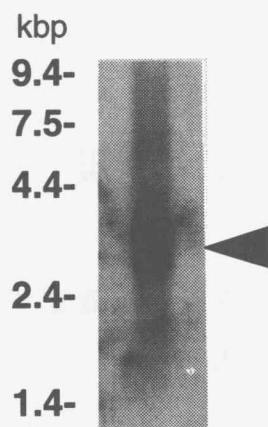


FIG. I-2. Detection of hPEPT1 mRNA in Caco-2 cells by Northern blot analysis. 5 μg of poly(A)⁺RNA from Caco-2 cells was electrophoresed and hybridized at high stringency with hPEPT1-specific probe including coding region for 196 - 708 amino acid residues.

第2節 PEPT1輸送活性に及ぼす免疫抑制剤の影響

まずCaco-2細胞へのglycylsarcosine取り込みに及ぼすタクロリムス及びシクロスポリンの処理時間依存的な影響について検討した。Fig. I-3に示すように、両免疫抑制剤の処理時間依存的に取り込み活性は低下したが、6日間処理以降glycylsarcosine取り込みは回復した。しかしながら2日目以降dishあたりの蛋白量が低下していたことから、細胞の増殖能が影響をうけている可能性が示された。従って、以後の検討は蛋白量に変化の認められない1日間処理で行った。

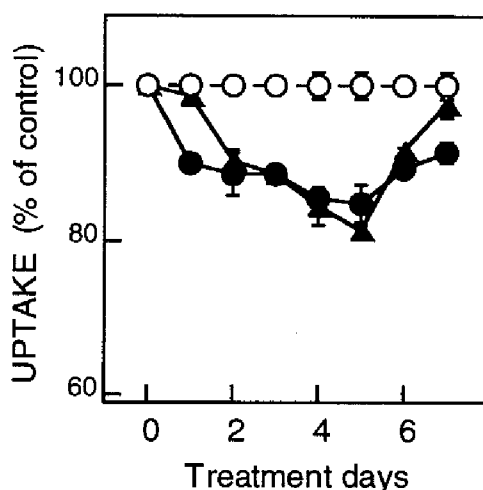


Fig. I-3. Effect of tacrolimus or cyclosporin A on [14 C]glycylsarcosine uptake by Caco-2 cells. Caco-2 monolayers were treated with 0.004% cremophor and 0.016% ethanol as vehicle (○), 20 μ M tacrolimus (●) or 10 μ M cyclosporin A (▲). After the treatments, the monolayers were rinsed once with incubation medium (pH 7.4) and then incubated for 10 min at 37°C with [14 C]glycylsarcosine (20 μ M) in incubation medium at pH 6.0. Thereafter, the radioactivity of solubilized cells was determined. Each point represents the mean \pm S.E. of three monolayers.

次にglycylsarcosine取り込みに及ぼすタクロリムス及びシクロスポリンの処理濃度依存的な影響について検討した。Fig. I-4Aに示すように、Caco-2細胞へのglycylsarcosine取り込みはこれら免疫抑制剤の処理濃度依存的に減少した。一方、比較対照として同様の処理を行った際のグルコース及びアラニン取り込みの変化について検

討したところ、タクロリムス低濃度処理群でグルコース取り込みが有意に低下するものの、これら免疫抑制剤の処理濃度依存的な取り込み活性の変化は認められなかった (Fig. I-4B)。またアラニンの取り込みにはこれらの免疫抑制剤処理による影響は認められなかった (Fig. I-4C)。

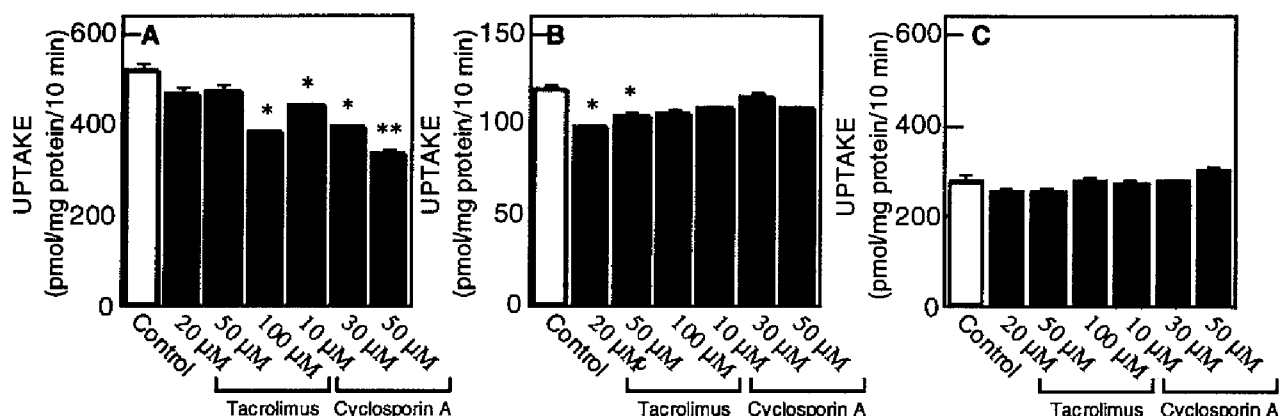


Fig. I-4. Concentration dependence of tacrolimus or cyclosporin A on [14C]glycylsarcosine (A), D-[3H]glucose (B) and L-[3H]alanine (C) uptake by Caco-2 cells. Caco-2 monolayers were incubated with various concentrations of tacrolimus or cyclosporin A for one day. Control cells were treated with 0.05% cremophor and 0.2% ethanol as vehicle. After the treatments, monolayers were rinsed once with incubation medium (pH 7.4) and then incubated for 10 min at 37°C with [14C]glycylsarcosine (20 μM) in incubation medium at pH 6.0 (A), with D-[3H]glucose (1 μM) in incubation medium at pH 7.4 (B) or with L-[3H]alanine (20 μM) in incubation medium at pH 6.0 (C). Thereafter, the radioactivity of solubilized cells was determined. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers. **P<0.01, *P<0.05, significant differences from control cells.

次にglycylsarcosine取り込みについて速度論的解析を行った。Fig. I-5にはタクロリムス (100 μM) 及びシクロスポリン (30 μM) で処理した際のglycylsarcosine取り込みの基質濃度依存性を示す。非特異的な取り込み活性はPEPT1の基質である非標識glycylleucineを大過剰共存させた際のglycylsarcosine取り込み量より算出した。すべての投与群において高濃度域で飽和性が観察され、非線形最小二乗法によりミカエリスメンテン式に当てはめ輸送パラメータを算出したところ、両免疫抑制剤処理群において最大輸送速度 (Vmax) の低下が認められた (Table I-1)。一方、ミカエリスメンテン定

数 (K_m) には、これら免疫抑制剤処理による変化は認められなかった。

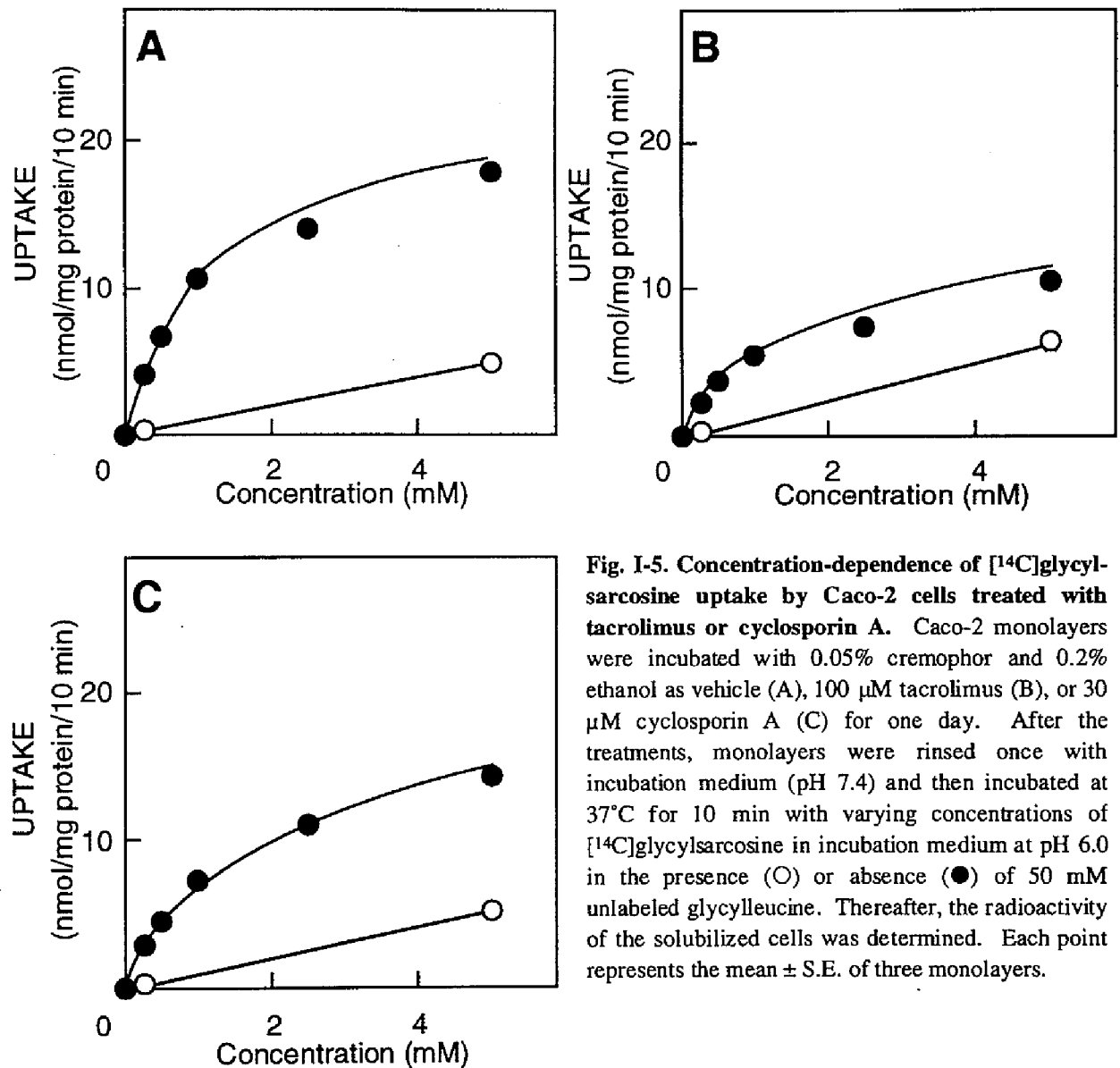


Fig. 1-5. Concentration-dependence of $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine uptake by Caco-2 cells treated with tacrolimus or cyclosporin A. Caco-2 monolayers were incubated with 0.05% cremophor and 0.2% ethanol as vehicle (A), 100 μM tacrolimus (B), or 30 μM cyclosporin A (C) for one day. After the treatments, monolayers were rinsed once with incubation medium (pH 7.4) and then incubated at 37°C for 10 min with varying concentrations of $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine in incubation medium at pH 6.0 in the presence (○) or absence (●) of 50 mM unlabeled glycylleucine. Thereafter, the radioactivity of the solubilized cells was determined. Each point represents the mean \pm S.E. of three monolayers.

Table I-1 Kinetic parameters of glycylsarcosine uptake by Caco-2 cells

	Km (mM)	Vmax (nmol/mg protein/10 min)
Control	0.83 ± 0.06	15.0 ± 2.1
Tacrolimus	0.65 ± 0.22	7.4 ± 1.4*
Cyclosporin A	0.77 ± 0.10	11.5 ± 1.3*

Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments. *P<0.05, significant difference from control.

次にこれら免疫抑制剤処理による小分子ペプチドの経細胞輸送量の変化について検討した。Fig. I-6に示すように、タクロリムスの処理濃度依存的にglycylsarcosine経細胞輸送量及び細胞内蓄積量の低下がみとめられた。またシクロスポリン処理群においてもコントロール群と比較して経細胞輸送量が有意に低下し、細胞内蓄積量も処理濃度依存的に低下することが示された (Fig. I-7)。

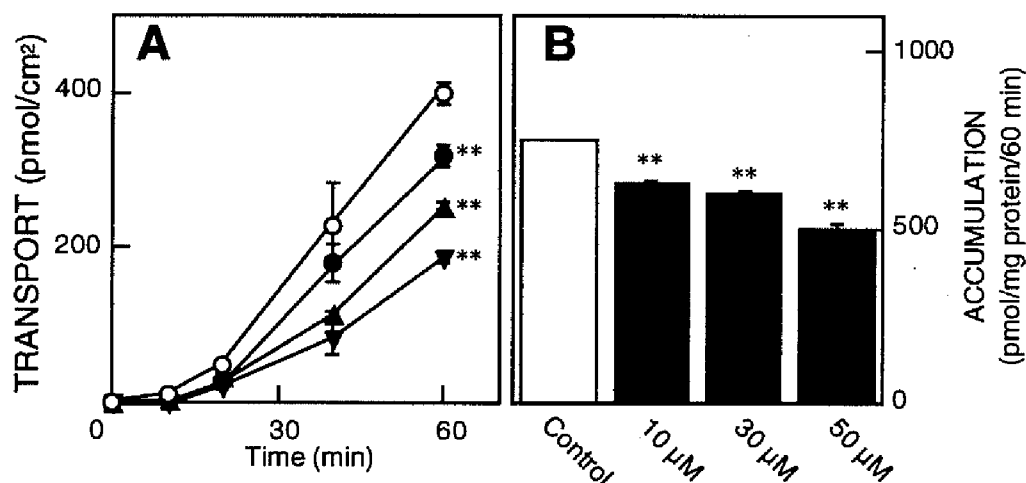


Fig. I-6. Effect of tacrolimus on the apical-to-basal transport (A) and cellular accumulation (B) of [¹⁴C]glycylsarcosine by Caco-2 cells. Confluent monolayers were incubated for one day with 0.02% cremophor and 0.08% ethanol as vehicle (○), 10 µM (●), 30 µM (▲) or 50 µM (▼) tacrolimus. After the treatments, [¹⁴C]glycylsarcosine (20 µM) and D-[³H]mannitol (50 µM) were added to the apical side of monolayers. (A) At the indicated times, medium on the basal side was collected (100 µl), and the radioactivity was measured. D-[³H]Mannitol was used to correct for paracellular flux. (B) After 60 min incubation, accumulation of [¹⁴C]glycylsarcosine in Caco-2 monolayers was determined. Each point or column represent the mean ± S.E. of three monolayers. **P<0.01, significant difference from control cells.

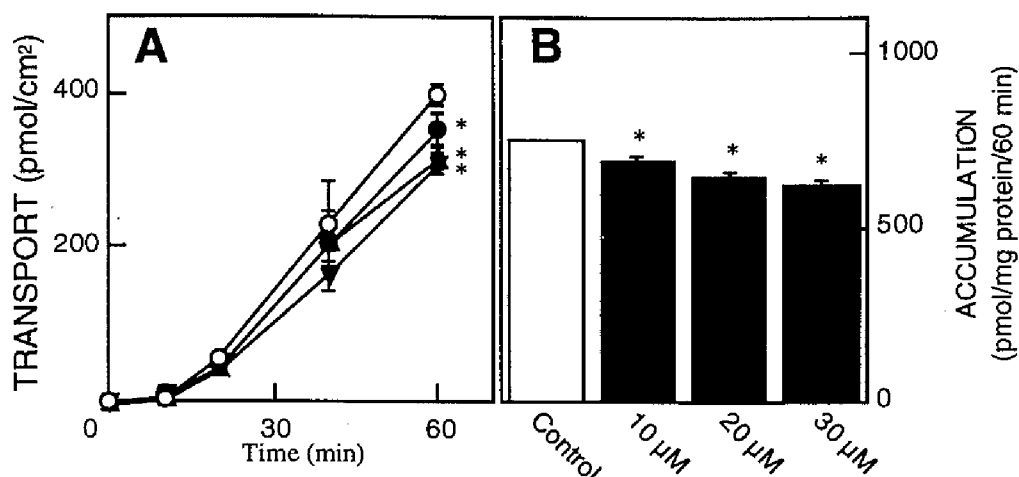


Fig. I-7. Effect of cyclosporin A on the apical-to-basal transport (A) and cellular accumulation (B) of [^{14}C]glycylsarcosine by Caco-2 cells. Confluent monolayers were incubated for one day with 0.02% cremophor and 0.08% ethanol as vehicle (○), 10 μM (●), 20 μM (▲) or 30 μM (▼) cyclosporin A. After the treatments, [^{14}C]glycylsarcosine (20 μM) and D- ^3H]mannitol (50 μM) were added to the apical side of monolayers. (A) At the indicated times, medium on the basal side was collected (100 μl), and the radioactivity was measured. D- ^3H]Mannitol was used to correct for paracellular flux. (B) After 60 min incubation, accumulation of [^{14}C]glycylsarcosine in Caco-2 monolayers was determined. Each point or column represent the mean \pm S.E. of three monolayers. * $P < 0.05$, significant difference from control cells.

第3節 免疫抑制剤によるPEPT1輸送活性の変動機構

速度論的解析の結果から、これら免疫抑制剤処理によるglycylsarcosine取り込みの低下が最大輸送速度の低下に起因することが示された。そこでタクロリムス及びシクロスポリン処理群においてPEPT1 mRNAの発現量を拮抗PCRにより定量した。しかし両処理群においてPEPT1 mRNAの有意な低下は認められなかった (Fig. I-8)。次にPEPT1の活性低下の要因として細胞膜傷害について検討を行った。細胞培養液中への乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の遊離量は両免疫抑制剤の処理濃度依存的に有意に上昇した (Fig. I-9A)。一方、頂側膜酵素であるアルカリフォスファターゼ (ALP) や γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GTP) の活性にはこれら免疫抑制剤による有意な変化は認められなかった (Fig. I-9B,C)。またdishあたりの蛋白量にも有意な変化は認められなかった (Fig. I-10)。

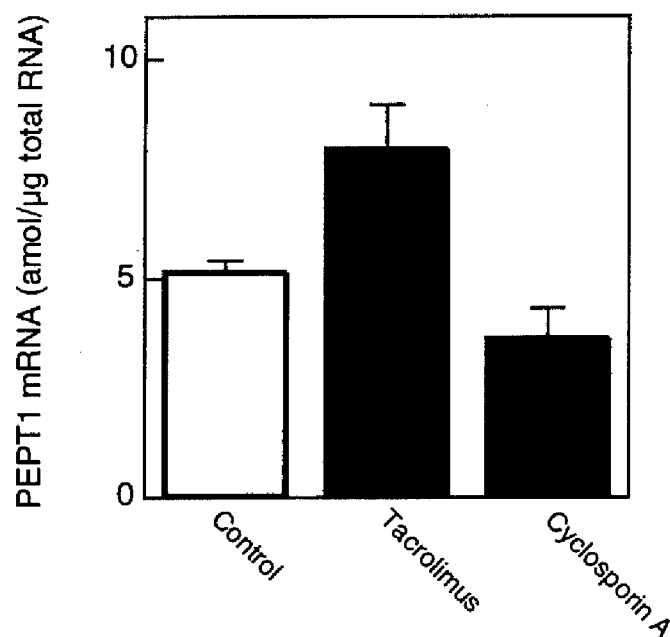


Fig. I-8. mRNA expression of PEPT1 in Caco-2 cells. Caco-2 monolayers were treated with tacrolimus (100 μM) or cyclosporin A (30 μM) for one day. Control cells were treated with 0.05% cremophor and 0.2% ethanol as vehicle. After the treatments, total cellular RNA was extracted from each treated cell and then human PEPT1 mRNA was quantified by the competitive PCR. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers.

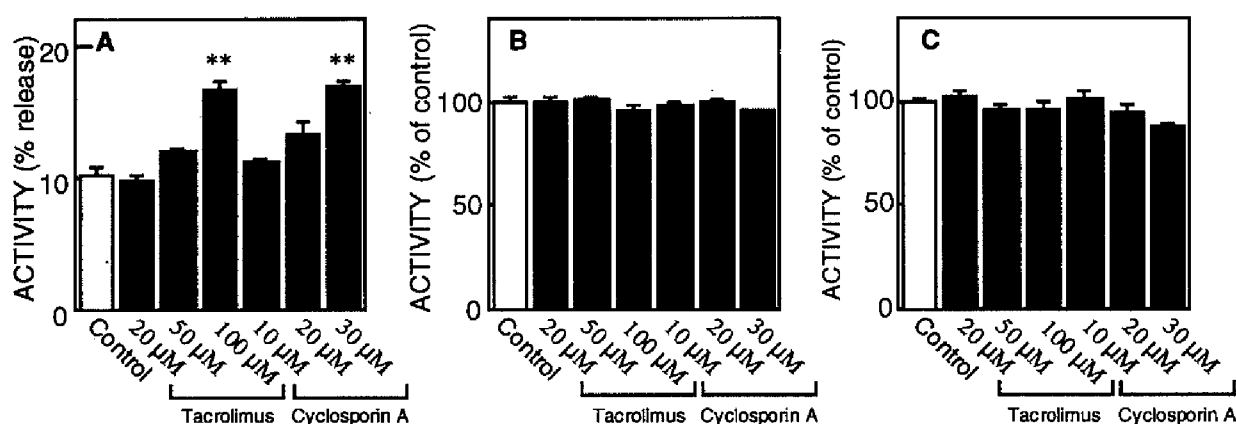


Fig. I-9. Effect of various concentrations of tacrolimus or cyclosporin A on the release of lactate dehydrogenase (A), alkaline phosphatase (B) and γ-glutamyltransferase (C) activity. Caco-2 monolayers were incubated with various concentrations of tacrolimus or cyclosporin A for one day. Control cells were treated with 0.05% cremophor and 0.2% ethanol as vehicle. After the treatments, lactate dehydrogenase activities in the culture medium and cell homogenates were determined, and the released lactate dehydrogenase activities in culture medium were represented as the percentage of total lactate dehydrogenase activities. After the one day treatment, alkaline phosphatase (B) and γ-glutamyltransferase (C) activities in cell homogenates were determined, and alkaline phosphatase and γ-glutamyltransferase activities were represented as the percentage of the activity of control cells. Each column represents the mean ± S.E. of three monolayers. **P<0.01, significant difference from control cells.

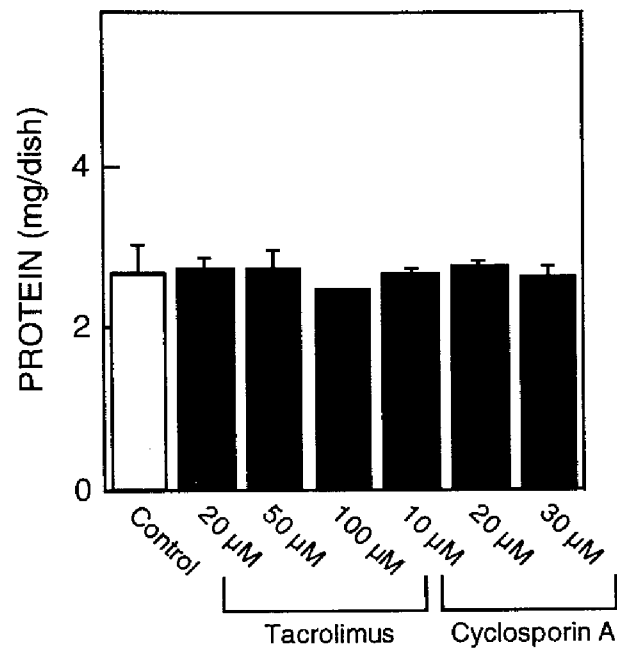


Fig. I-10. Effect of various concentrations of tacrolimus or cyclosporin A on protein contents of Caco-2 monolayers. Caco-2 monolayers were incubated with various concentrations of tacrolimus or cyclosporin A for one day. Control cells were treated with 0.05% cremophor and 0.2% ethanol as vehicle. After the treatments, the protein contents in cell homogenates were determined. Each column represents the mean \pm S.E. of three monolayers.

考 察

Caco-2細胞はヒト大腸ガン由来の培養細胞であり、小腸上皮細胞様の性質を呈することが知られている²⁵⁾。この細胞にはグルコース^{31, 32)}、アミノ酸³³⁻³⁶⁾、リン酸³⁷⁾、胆汁酸³⁸⁾などの輸送体が発現しており、小腸のモデル細胞として広く用いられている。またCaco-2細胞は小分子ペプチド輸送体が発現することが明らかにされており、 H^+ /ペプチド共輸送体の機能解析にも用いられている^{6, 11, 14, 26-30)}。本章ではCaco-2細胞におけるペプチド輸送に及ぼす免疫抑制剤の影響について検討した。

まずCaco-2細胞にPEPT1が発現することを確認した。PEPT1は H^+ 勾配を駆動力として、 H^+ とペプチドを共輸送する。hPEPT1の合成RNAをインジェクションすることによりヒトPEPT1を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞では、細胞外酸性領域においてglycylsarcosine取り込みが顕著に増大し、これは細胞外酸性化によりPEPT1の小分子ペプチド輸送が増加するというLiangらによる報告と一致した⁸⁾。Caco-2細胞へのglycylsarcosine取り込みも細胞外酸性領域において増大し、またノーザンブロット解析により認められたPEPT1 mRNAのシグナルはこれまで報告されているヒトPEPT1の全長とほぼ一致するものであった。従って、Caco-2細胞においてPEPT1が発現し機能することが確認された。

タクロリムス及びシクロスポリン処理によりCaco-2細胞へのglycylsarcosine取り込み量は処理濃度依存的に減少し、速度論的解析から親和性 (K_m) の変化ではなく、最大輸送速度の減少に起因することが示された。最大輸送速度が低下する要因として、PEPT1の発現量が低下することが予測されたため、拮抗PCR法によりPEPT1 mRNAを定量したが、これら免疫抑制剤処理によるPEPT1 mRNA量の有意な低下は認められなかった。従って小分子ペプチド輸送が低下する要因としてPEPT1の発現量低下以外の可能性が考えられた。

アルカリフォスファターゼ及び γ -グルタミルトランスフェラーゼは、Caco-2細胞の頂

側膜に局在することが知られている^{39, 40)}。また乳酸デヒドロゲナーゼは細胞内においてピルビン酸より乳酸を生成することで、 NAD^+ から NADH を生成する酵素であり、細胞膜傷害が惹起されると乳酸デヒドロゲナーゼの細胞外への漏出量が上昇すると考えられている⁴¹⁾。本章において、dishあたりの蛋白量が変化せず、乳酸デヒドロゲナーゼの細胞外への遊離量が免疫抑制剤の処理濃度依存的に増加したことから、頂側膜傷害が惹起されていることが示唆された。しかしアルカリフォスファターゼ及び γ -グルタミルトランスフェラーゼの活性に変化が認められないことより、この膜傷害は頂側膜に発現するすべての膜蛋白機能を低下させるものではないと考えられる。またグルコースやアラニンの取り込み量が変化せずglycylsarcosine取り込みのみが変化してたことから、タクロリムス及びシクロスポリンに対する感受性がそれぞれの膜蛋白によって異なることを示唆している。これまでも上皮細胞であるMDCK細胞の膜酵素活性に及ぼすシクロスポリンの影響が、それぞれの膜酵素によって異なることが示されている^{42, 43)}。従って免疫抑制剤により誘発される膜傷害に対してPEPT1の機能がグルコースやアミノ酸の輸送体よりも影響を受けやすいことが推察される。

Keelanらはシクロスポリン投与によりラット小腸の刷子縁膜の脂質組成が変化することを示している⁴⁴⁾。またシクロスポリンが肝臓の細胞膜脂質組成や膜流動性を変化させ、膜蛋白の機能を低下させるとの報告もある⁴⁵⁾。膜蛋白機能は細胞膜の組成や流動性により活性が変化することが知られている。例えば Na^+ /硫酸共輸送体⁴⁶⁾は膜流動性が低下すると輸送活性が低下し、 Na^+ /リン酸共輸送体⁴⁷⁾は膜流動性が上昇すると輸送活性が上昇することが示されている。また有機カチオン輸送体や有機アニオン輸送体は膜流動性が上昇することにより活性が低下することが報告されている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。PEPT1が膜流動性によってどのような活性変動を生じるかについては詳細は不明であるが、免疫抑制剤処理による膜流動性の変化がPEPT1の活性低下を惹起した可能性も考えられる。

タクロリムス及びシクロスポリンによる免疫抑制作用の発現機構は、T細胞のIL-2産生阻害であり、これらの薬物は全く違う分子構造であるにもかかわらず、免疫抑制作用の発現機構は非常に類似している⁵¹⁾。タクロリムス及びシクロスポリンは細胞内でそれ

ぞれFKBPもしくはシクロフィリンと結合し、これら重合体がカルシニューリンのリン酸化作用を阻害することによってIL-2の転写が抑制される。一方、これまでにPEPT1の活性を調節する因子はいくつか報告されており、FujitaらはシグマレセプターのリガンドによってPEPT1のmRNA量が増加しglycylsarcosine取り込みの最大輸送速度が上昇することを示している⁵²⁾。またThamotharanらはインスリンで処理することにより、ペプチド輸送活性が上昇することを明らかにし、そのメカニズムとしてPEPT1蛋白の細胞膜への移行量を上昇させることに起因すると考察している⁵³⁾。セカンドメッセンジャーによるPEPT1の制御としてはPKCの活性化剤によりPEPT1の活性が低下すること⁵⁴⁾やcAMPがPEPT1の輸送活性を低下させるが、プロテインキナーゼCの阻害剤によりこの活性低下が認められなくなることなどが報告されている⁵⁵⁾。腎遠位尿細管のモデル細胞であるMDCK細胞にもH⁺駆動型小分子ペプチド輸送体が発現することが示され、カルモジュリンのアンタゴニストであるW-7によってジペプチドの輸送活性が低下することが示されていることから⁵⁶⁾、PEPT1の活性制御にカルモジュリンが関わる可能性も考えられる。しかし現状では、カルシニューリンを介した細胞内情報伝達系とPEPT1の活性制御機構との関わりを示唆する情報は得られておらず、タクロリムス及びシクロスポリンが細胞内情報伝達系を介してPEPT1活性に影響を及ぼす可能性については不明である。

小腸における小分子ペプチドの吸収については、頂側膜から取り込まれた小分子ペプチドが細胞内で分解されアミノ酸の形として血管側に輸送されと考えられているが、側底膜にも小分子ペプチドを認識する輸送体が存在することが明らかにされている^{27, 28, 57)}。今回PEPT1の基質として用いたglycylsarcosineは加水分解抵抗性の小分子ペプチドであることが示されており^{58, 59)}、ジペプチドの形で側底膜側に排出されていると考えられる。本検討においては、側底膜型ペプチド輸送体の活性に及ぼすこれら免疫抑制剤の影響については明らかではない。しかし側底膜型ペプチド輸送体が促進拡散型の輸送体であること、また経細胞輸送量と細胞内蓄積量が同時に低下したことにより、主として頂側膜におけるPEPT1の輸送活性低下によって小分子ペプチドの経細胞輸送量が低下したと考えられる。

本章において、著者は免疫抑制剤が小腸PEPT1の活性を低下させることを明らかにした。またこれら免疫抑制剤処理によって頂側膜傷害が惹起され、これがPEPT1の輸送活性低下の要因であることが示唆された。さらにPEPT1の輸送活性低下により頂側膜側から側底膜側への小分子ペプチドの経細胞輸送量も低下することが示され、これら免疫抑制剤処理により小腸からの小分子ペプチド吸収が低下する可能性が示された。

第Ⅱ章 ラット小腸ペプチド輸送体に及ぼす免疫抑制剤投与の影響

第Ⅰ章においてタクロリムス及びシクロスポリンが小腸上皮細胞のペプチド輸送活性を低下させることが判明した。一方、これらの免疫抑制剤は臨床において継続的に投与されるが、連続投与時における小腸ペプチド輸送体に及ぼす影響については不明である。本章では、タクロリムス及びシクロスポリンを連続投与した際の小腸ペプチド輸送体への影響を明らかにするため、ラットに免疫抑制剤を連続投与後、小腸組織中への glycylsarcosine 取り込み活性の変動と PEPT1 の発現量変化について検討を行った。

第1節 免疫抑制剤投与による生理的パラメータの変動

過去の報告から小腸機能に影響を及ぼすと考えられるタクロリムス 5 mg/kg/2 days²¹⁾ 及びシクロスポリン 30 mg/kg/2 days¹⁹⁾ を14日間皮下投与した。まず投与期間中のラットの体重及び餌の摂取量を経日的に測定した。コントロール群では経日的に体重が増加し、13日間で約44 g の体重増加が認められた (Fig. II-1A)。一方、タクロリムス及びシクロスポリン投与群では体重がほとんど増加せず、投与13日目においても免疫抑制剤の投与開始前とほぼ同程度の体重であった。また免疫抑制剤投与を開始すると餌の摂取量は減少したが、タクロリムス投与群では投与開始9日目以降コントロール群と同程度まで回復し (Fig. II-1B)、以後13日目まで再び低下することはなかった。一方シクロスポリン投与群では餌の摂取量の回復は認められなかった。全血中パラメータをクリニカルアナライザーを用いて計測したところ、両免疫抑制剤投与群でBUN値の有意な上昇が認められ腎機能の低下が示唆されたが (Table II-1)、グルコースやK⁺濃度には有意な変化は認められずタクロリムス及びシクロスポリンの副作用である耐糖能の異

常や高カリウム血症などは惹起されていないことが示された。

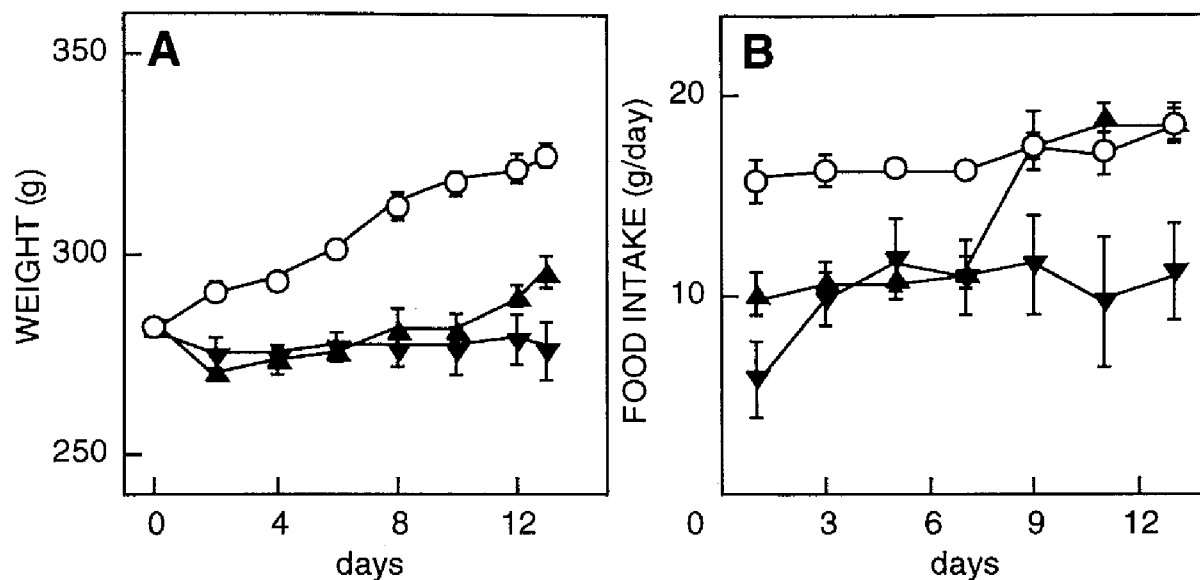


Fig. II-1. Weight change (A) and food intake (B) of the rats following tacrolimus and cyclosporin A administration. Vehicle (○), tacrolimus 5 mg/kg/2 days (▲), or cyclosporin A 30 mg/kg/2 days (▼) was administered to the rats. Each point represents the mean \pm S.E. of 4-10 experiments.

Table II-1. Blood parameters of rats treated with tacrolimus or cyclosporin A

	Glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)	K (mmol/l)
Control	101.9 \pm 9.1	12.9 \pm 1.4	2.7 \pm 0.2
Tacrolimus (5 mg/kg/2 days)	89.8 \pm 4.1	21.8 \pm 2.3*	3.0 \pm 0.3
Cyclosporin A (30 mg/kg/2 days)	79 \pm 2.3	27.3 \pm 2.3*	2.3 \pm 0.2

Each value represents the mean \pm S.E. of 3-10 experiments. *P<0.05, significant difference from control.

第2節 免疫抑制剤投与によるPEPT1の活性変動

小腸における小分子ペプチド吸収能を評価するため、反転腸管へのglycylsarcosine取り込み量を測定したところ、時間依存的に取り込み量が増加し5分以降で飽和性が認められた (Fig. II-2)。従って以後の実験は取り込み量が直線性を示した3分間で行った。Fig. II-3Aに示すようにタクロリムス投与群の空腸及び回腸へのglycylsarcosine取り込み量には変化は認められなかった。一方、シクロスポリンを投与したラットの空腸へのglycylsarcosine取り込みはコントロール群と比較して約1.4倍の有意な増加が認められた (Fig. II-3B)。しかし回腸への取り込み量には変化が認められなかった。glycylsarcosine取り込みの上昇が認められた空腸において速度論的解析を行ったところ、シクロスポリン投与群の最大輸送速度がコントロールに比べ上昇することが示唆された (Fig. II-4) (コントロール群、 $0.9 \mu\text{mol/g wet tissue}/3 \text{ min}$ 、シクロスポリン投与群、 $2.0 \mu\text{mol/g wet tissue}/3 \text{ min}$)。

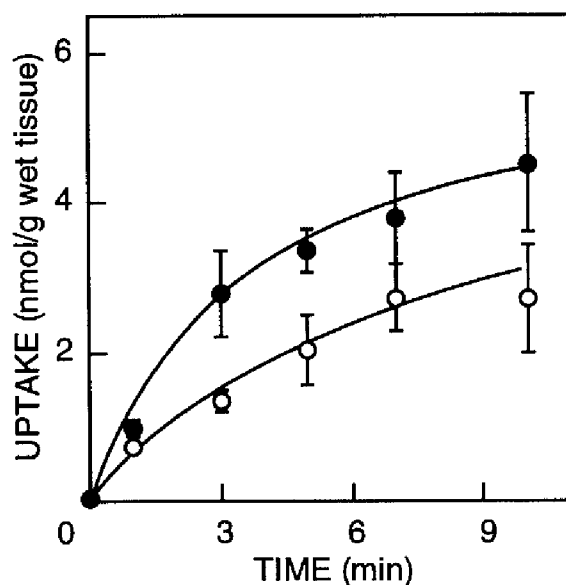


Fig. II-2. Accumulation of [^{14}C]glycylsarcosine into everted intestinal segments. Everted jejunal (●) or ileal (○) segments were incubated with incubation medium containing $5 \mu\text{M}$ [^{14}C]glycylsarcosine for specified period at 37°C . At the end of incubation, the radioactivity in solubilized intestinal segments was determined. Each point represents the mean \pm S.E. of 5 experiments.

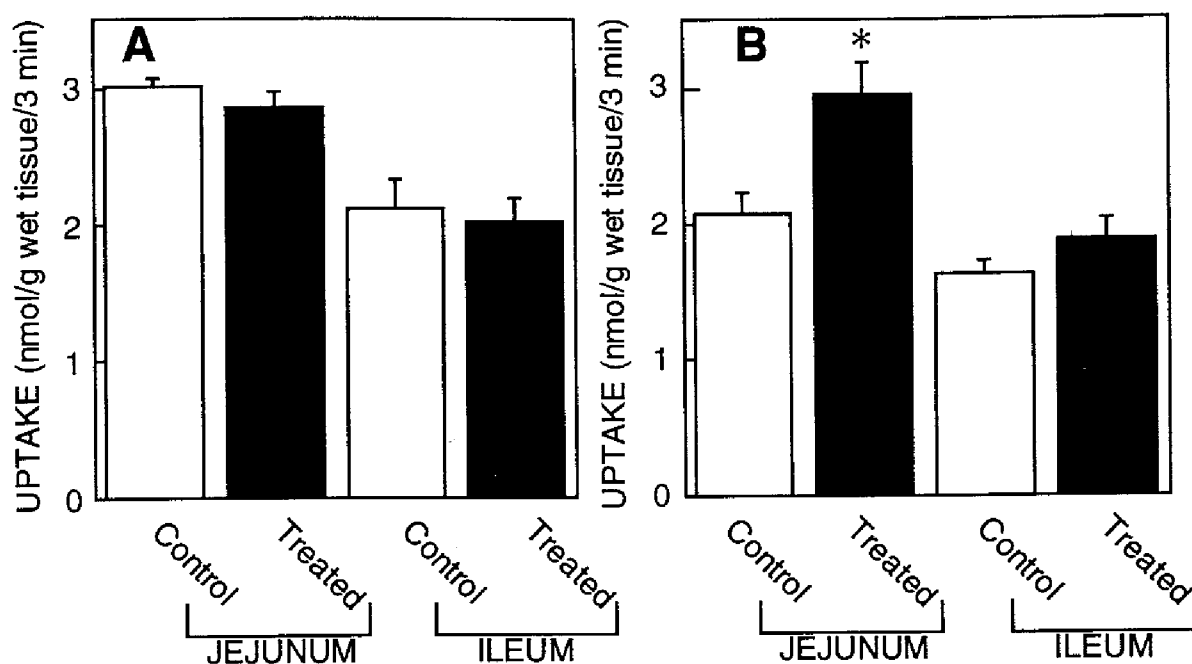


Fig. II-3. Effects of tacrolimus (A) and cyclosporin A (B) on $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine uptake by the everted intestines. Everted intestinal segments were incubated with incubation medium containing $5\ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine for 3 min at 37°C . At the end of incubation, the radioactivity in solubilized intestinal segments was determined. Each column represents the mean \pm S.E. of 7-16 experiments. * $P < 0.05$, significant difference from control.

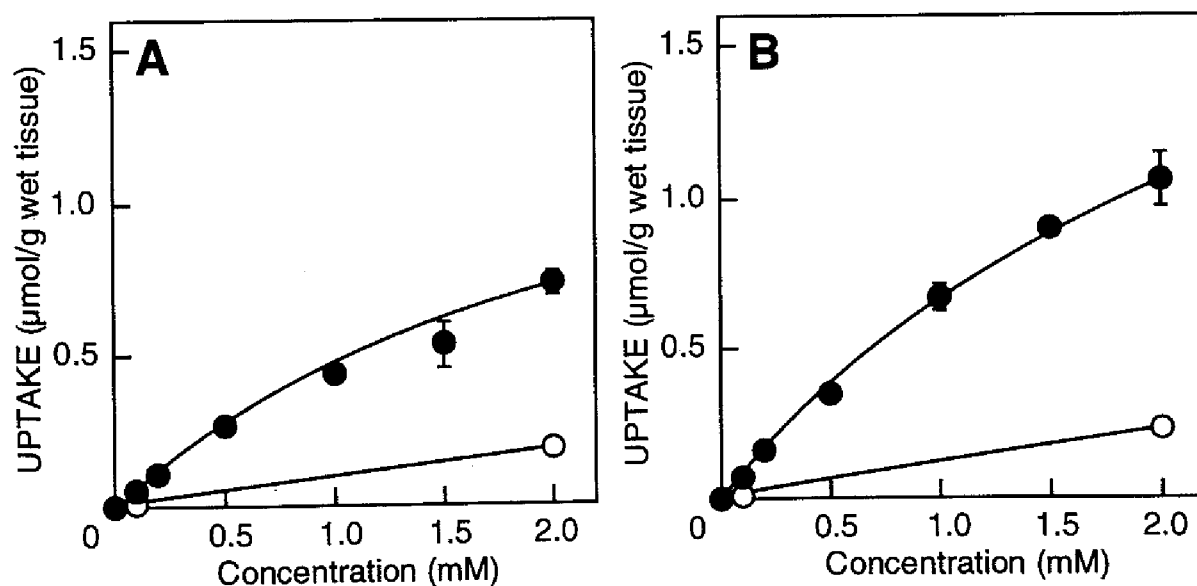


Fig. II-4. Concentration dependence of $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine uptake by rat everted jejunum treated with vehicle (A) or cyclosporin A (B). The everted jejunal segments were incubated with varying concentrations of $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine in incubation medium for 3 min at 37°C in the absence (●) or presence (○) of 50 mM unlabeled glycylleucine. Each point represents the mean \pm S.E. of 4-8 experiments.

第3節 免疫抑制剤投与によるPEPT1の発現変動

速度論的解析の結果からシクロスポリンによる glycylsarcosine 取り込みの変化が PEPT1 蛋白の発現量変化に起因することが推測されたため、ウエスタンブロット解析を行った。Fig. II-5に示すように空腸及び回腸においてPEPT1及び内部標準として用いた Villin 蛋白のシグナルがともに認められた。またPEPT1蛋白の発現量は、タクロリムス及びシクロスポリン投与群でコントロール群より増加傾向を示したが Villin 蛋白の発現量には顕著な変化は認められなかった。さらにウエスタンブロット解析の結果について画像解析を行い数値化したところ、タクロリムス及びシクロスポリン投与群において認められたPEPT1蛋白の発現量上昇はコントロール群と比較して約3.5倍であることが判明した (Fig. II-6A)。一方、回腸におけるPEPT1の発現量には変化が認められなかった (Fig. II-6B)。

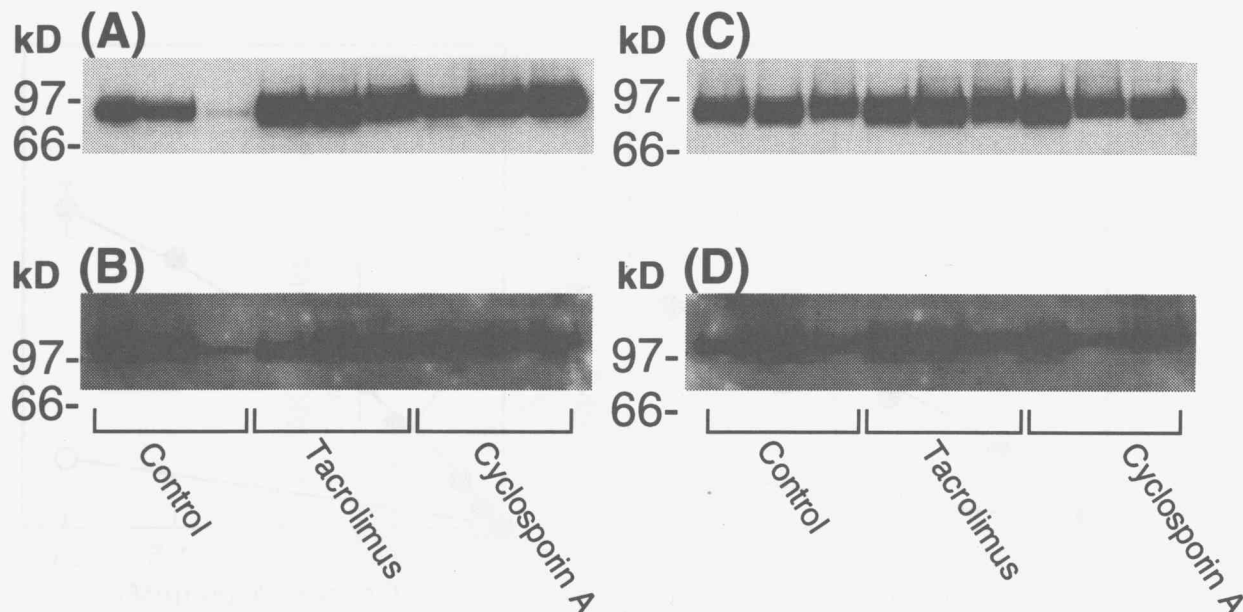


Fig. II-5. Western blot analysis of crude plasma membranes from the jejunum (A, B) or ileum (C, D) for PEPT1 (A, C) and villin (B, D). Crude membranes (20 μ g) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (8%) and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. The antisera for PEPT1 and goat anti-villin polyclonal IgG (1:1000 dilution) were used as primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-goat IgG antibodies were used for detection of the bound antibodies.

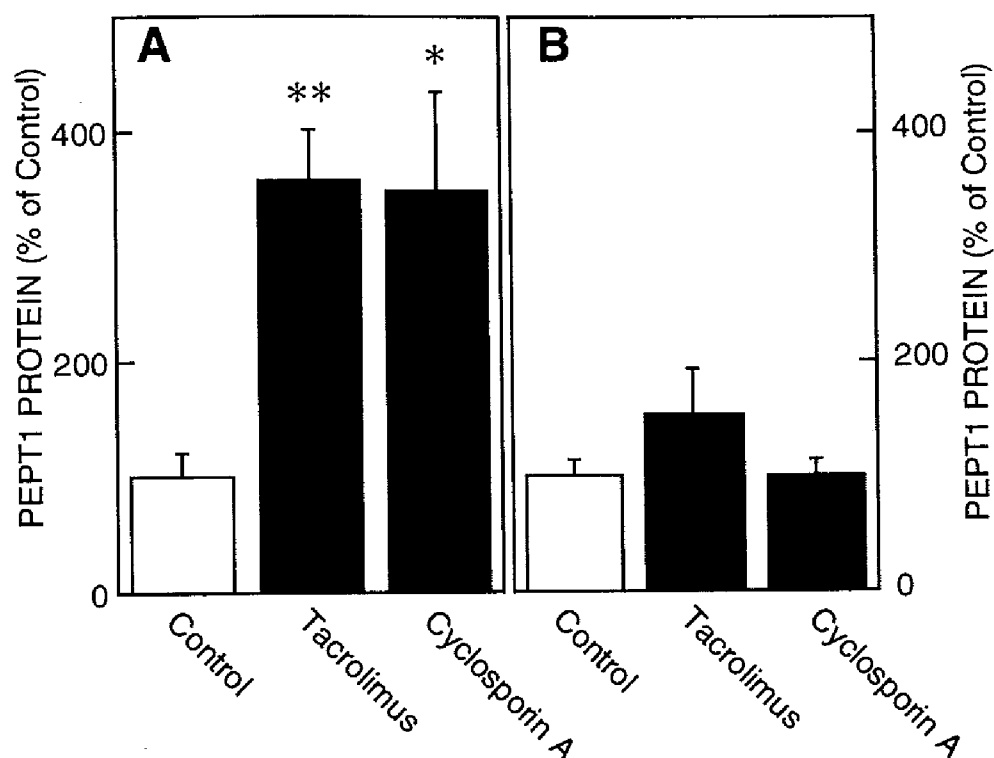


Fig. II-6. Levels of PEPT1 protein expression in the rat jejunum (A) or ileum (B). The bands in Fig. II-5 were quantified densitometrically, and the amount of villin protein was used as an internal control. The data are represented as percentages of the amount of control. Each column represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significant differences from control.

また、小腸刷子縁膜に発現することが知られている Na^+ /グルコース共輸送体SGLT1⁶⁰⁾の発現についても、PEPT1の発現上昇が認められた空腸において検討したが、Fig. II-7に示すようにSGLT1の発現量に有意な変化は認められなかった。

タクロリムス及びシクロスポリン投与によるPEPT1蛋白の発現量上昇がmRNA量の上昇に起因する可能性が考えられたため、小腸組織におけるPEPT1 mRNA量の定量を試みた。しかし小腸組織でのPEPT1 mRNA量は、空腸においてPEPT1蛋白の発現量が上昇しているにも関わらず、空腸及び回腸共に両免疫抑制剤投与による変化は認められなかった (Fig. II-8)。

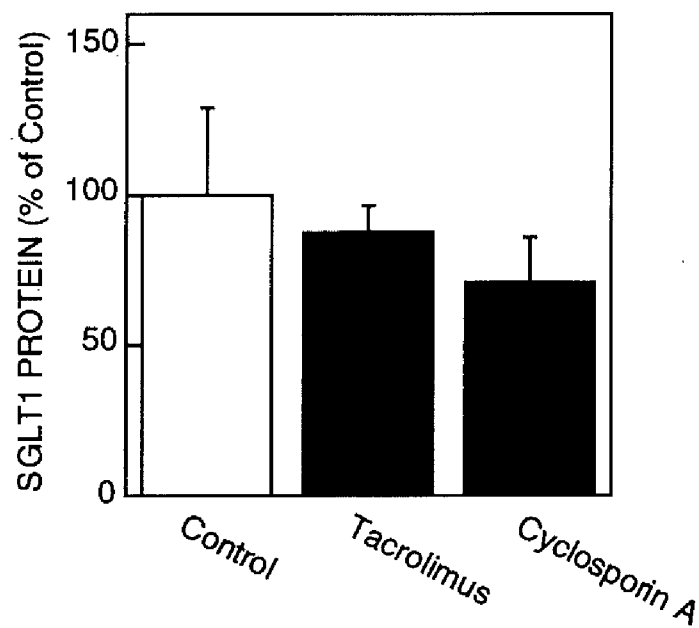


Fig. II-7. Levels of SGLT1 protein expression in the rat jejunum. The data are represented as percentages of the amount of control. Each column represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

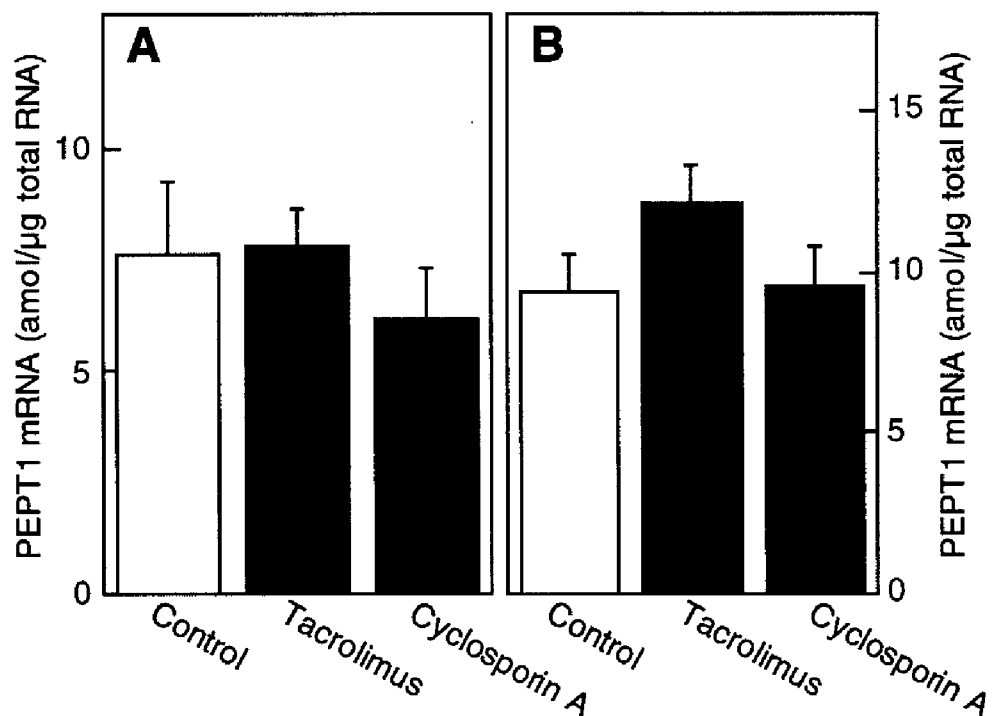


Fig. II-8. Levels of PEPT1 mRNA expression in the rat jejunum (A) or ileum (B). Total RNA was isolated from the intestine of rats treated with vehicle, tacrolimus or cyclosporin A. Isolated RNA was reverse-transcribed and PEPT1 mRNA was quantified by 5' nuclease assay with an ABI PRISM 7700 sequence detector. Each column represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments.

考 察

第I章において、タクロリムス及びシクロスポリン処理によりCaco-2細胞のペプチド輸送活性が低下することが示された。これらの免疫抑制剤は臨床において連続投与されることから、本章では免疫抑制剤を連続投与した際のラット小腸ペプチドトランスポータの活性及び発現変動について検討した。

これまでにタクロリムス及びシクロスポリン投与により実験動物の体重増加量が低下することが示されてきたが^{19, 21)}、著者の検討においても同様に免疫抑制剤投与によって体重の増加量がコントロールと比較して減少した。またSigaletらによってシクロスポリン投与により小腸に形態学的変化が生じることが示されており¹⁹⁾、本検討でのシクロスポリン投与群において小腸の形態学的な変化が生じている可能性は考えられる。一方、BUN値の有意な上昇が認められたことから、免疫抑制剤投与群で弱い腎障害が惹起されていることが示唆された。しかし、全血中のグルコースや K^+ 濃度に有意な変化が認められなかったことから、これら免疫抑制剤の副作用である耐糖能異常や高カリウム血症などは惹起されていないものと考えられた。

これまでにペプチドトランスポータの発現に及ぼす食餌の影響について報告されている。絶食条件下においてPEPT1の発現量は増加すること⁶¹⁻⁶³⁾、また食餌中のジペプチドによってもPEPT1の発現量は増加する⁶⁴⁾。さらにCaco-2細胞系において、PEPT1の基質である小分子ペプチドを培養液中に存在させることによりPEPT1の発現が上昇することも示されている^{65, 66)}。すなわち食物が枯渇するような状態、または基質である小分子ペプチドが豊富に存在する際に、ペプチドトランスポータの活性及び発現が上昇すると考えられる。今回、免疫抑制剤処理により餌の摂取量が減少したことがPEPT1蛋白の発現量に影響を与えた可能性は否定できない。しかし、従来報告されたPEPT1蛋白の発現量変動がmRNAの発現変動と相関するのに対し⁶²⁻⁶⁶⁾、本研究においてはPEPT1 mRNA量に変化が認められないこと、タクロリムス投与群では9日目以降餌の摂取量はコント

ロールと同程度まで回復するが、これらの実験群でも PEPT1 蛋白の発現量増加が認められることなどを考慮すると、免疫抑制剤投与による PEPT1 蛋白の発現変動を餌の摂取量変化に起因するものだけでは説明できないと推測される。

小腸小分子ペプチド輸送体は、PEPT1 としてクローニングされる以前より非日常的な状況に対して耐性があることが示唆されてきた⁶⁷⁻⁶⁹⁾。また抗ガン剤フルオロウラシル (5-FU) による消化管傷害のためグルコースやグリシンの輸送活性が低下しても、PEPT1 の発現誘導によりペプチド輸送活性は保持されることが示されている⁷⁰⁾。一方、タクロリムス及びシクロスポリンは細胞および細胞膜に傷害を与えるとの報告や^{71, 72)}、シクロスポリンが小腸の刷子縁膜の膜組成を変化させるとの報告もある⁴⁴⁾。第 I 章で示したように、Caco-2 細胞の頂側膜に対してこれら免疫抑制剤が傷害作用を示すことが明らかとなり、ラット小腸組織も免疫抑制剤による傷害を受けていることが推察される。免疫抑制剤を投与したラット空腸では、PEPT1 の発現量上昇と活性の変動は必ずしも一致しておらず、PEPT1 蛋白の発現量上昇は活性変動に比べ大きいものであったことから、PEPT1 蛋白の輸送活性を低下させる要因があるものと推察される。これまでに腎培養上皮細胞である NLB-1 の Na^+, K^+ -ATPase 活性をシクロスポリンが低下させるものの、 Na^+, K^+ -ATPase 蛋白の発現量には影響を及ぼさないことが示されている⁷³⁾。また MDCK C7 細胞で Na^+, K^+ -ATPase の活性が低下するものの発現量が維持されていることや、MDCK C11 細胞では Na^+, K^+ -ATPase 蛋白の発現量が増加するものの、輸送活性は増加しないことが報告されている⁴²⁾。Deppe らはこの結果について、 Na^+, K^+ -ATPase の活性が低下するものの輸送体の発現量が上昇することによって全体としての輸送能が維持されるものと考察している⁴²⁾。本章におけるタクロリムス処理群での結果も PEPT1 蛋白の発現量が上昇するものの取り込み活性は変化していないことから、タクロリムス及びシクロスポリンが小腸上皮細胞に対して傷害作用を及ぼし PEPT1 蛋白の輸送活性を低下させるものの、PEPT1 蛋白の発現量が上昇することによって小腸組織あたりのペプチド吸収能は維持されていると推察された。

これまでに抗ガン剤 5-FU により誘発される小腸傷害に対しては、PEPT1 mRNA が上

昇することによりPEPT1蛋白の発現量と小腸刷子縁膜のペプチド輸送活性は維持され、5-FUに対して耐性を示すことが報告されている⁷⁰⁾。しかし本研究ではPEPT1 mRNAの発現量上昇は認められず、PEPT1蛋白量のみが上昇していたことから、本章で認められたPEPT1蛋白の発現誘導機構は、5-FUによって惹起された小腸傷害に対するPEPT1の発現誘導機構とは異なるものと考えられる。mRNA量に変化せず蛋白の発現量のみが上昇するメカニズムとしては、PEPT1蛋白の細胞膜における安定性の上昇などが考えられる。Khayatらは、2,4-dinitro-phenolによって惹起されるmetabolic stressに対し、グルコース輸送体であるGLUT3がmRNA量を増加させることなく蛋白量を増加させると報告している⁷⁴⁾。この機構としてGLUT3の細胞膜における半減期が延長することを示している。すなわちmetabolic stressに対しGLUT3蛋白の消失速度が低下することによって膜表面に発現するGLUT3蛋白量がmRNA量が増加することなく上昇していることを明らかにしている。これまでに頂側膜に発現するPEPT1蛋白の半減期に関する検討はなされていないが、本章においてPEPT1蛋白の発現量が上昇した機構として、頂側膜に発現したPEPT1蛋白の半減期が延長した可能性が考えられる。

本章において小腸を空腸と回腸の両部位に分けて比較検討を行ったが、回腸ではペプチドの取り込み活性とPEPT1の発現量が共に変化していないことから、空腸に比べて免疫抑制剤の影響を受けにくいことが考えられる。タクロリムス及びシクロスポリンはともに細胞内から細胞外への汲み出しポンプとして働くP-糖蛋白質の基質であることが知られている⁷⁵⁾。またラットではP-糖蛋白質の発現量には部位差が存在し空腸よりも回腸において発現量が多いこと⁷⁶⁾、またP-糖蛋白質によって輸送される基質の管腔中への輸送活性が空腸よりも回腸において高いことが示されている⁷⁷⁾。またヒトではシクロスポリンの小腸における吸収量とP-糖蛋白質のmRNA量との間に相関が認められることも報告されている⁷⁸⁾。従ってP-糖蛋白質の発現量が異なることによって空腸と回腸組織中の免疫抑制剤濃度に差が生じるために、免疫抑制剤による影響に部位差が生じることが推察される。

本章ではタクロリムス及びシクロスポリンを連続投与した際に、PEPT1蛋白の発現量が上昇し小腸管腔からのペプチド吸収能は維持もしくは増加する事を明らかにした。PEPT1蛋白の発現量の上昇が活性の変動に比べ大きかったことや第I章で示された免疫抑制剤のCaco-2細胞への影響を考えあわせると、免疫抑制剤投与によりペプチド輸送活性の低下が生じるもののPEPT1蛋白の発現量が上昇することにより、小腸ペプチド吸収能は維持されるものと推察された。

第Ⅲ章 小腸移植ラットにおける小腸ペプチド輸送体の発現変動

近年の移植医療の進展に伴い、短腸症候群等の治療法として小腸移植が期待されており²³⁾、国内でも既に数例の小腸移植が実施されている²⁴⁾。移植医療において術後の移植臓器の機能保持は治療の成否に関わる重要な要素である。小腸移植における術後評価は生体検査より得られる組織標本の組織学的検討と移植患者の体重変動を主な指標としている。しかし小腸吸収機能が輸送体によって担われているにもかかわらず、移植小腸における輸送体の変動については不明な点が多く残されていた。一方、前2章より小腸移植の術後管理に用いられる免疫抑制剤タクロリムスが小腸PEPT1に影響を及ぼすことが示された。そこで本章ではラット小腸移植モデルを用い、タクロリムスにより拒絶反応を抑制した移植小腸におけるPEPT1の発現について検討を行った。

第1節 移植小腸の組織学的検討

今回行った移植はすべて異所性移植でありレシピエントの腸管を残したままドナーの腸管を移植するものである。実験群として同系移植（ドナー：ルイスラット、レシピエント：ルイスラット）と異系移植（ドナー：ブラウンノルウェーラット、レシピエント：ルイスラット）を作成した。同系移植は免疫反応を抑制しなくても拒絶反応が起こらず、一般に移植手術などの影響について検討するためのコントロールとして用いられる。異系移植は免疫反応を抑制しないと拒絶反応が生じるため、異系移植はさらにタクロリムス投与によって免疫反応を抑制した群とタクロリムス非投与群の2群について検討した。まず小腸移植ラットにおける拒絶反応の有無を生体標本の組織学的検討により同定した。移植後7日目の小腸サンプルをパラフィン包埋した後ヘマトキシリン-エオシン染色し、

顕微鏡下で観察した。拒絶反応の起こらないと考えられる同系移植では拒絶反応を示す兆候は認められず、小腸組織は保持されていた (Fig. III-1A)。一方、異系移植を行ったラットでは小腸絨毛の平坦化など深刻な拒絶反応を示す兆候が観察され、上皮細胞が崩壊し脱落していた (Fig. III-1B)。タクロリムスを投与した異系移植ラットでは上皮組織は保持されており拒絶反応を示す兆候は認められなかった (Fig. III-1C)。

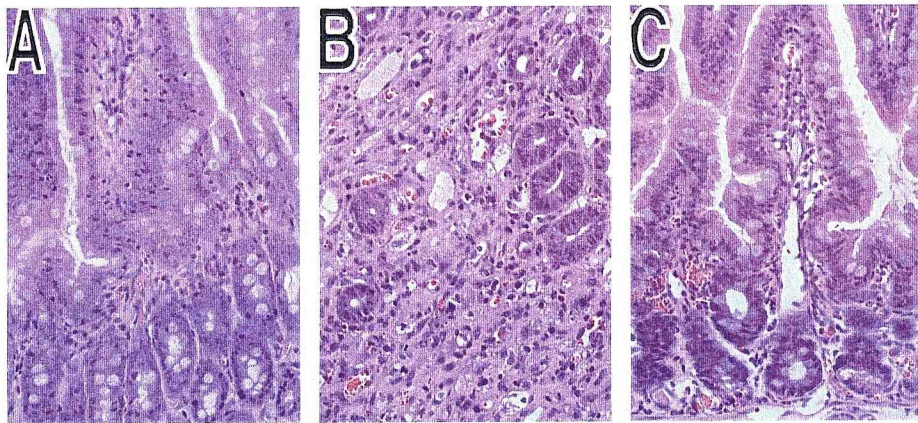


Fig. III-1 Sections of isografts (A), untreated (B) and tacrolimus-treated (C) allografts on day 7 following small intestinal transplant. No histopathological changes were detected in the isograft (A). Inflammatory infiltrates distributed throughout the intestine and extensive necrosis and ulceration were seen in allograft obtained from tacrolimus-untreated recipient (B). Allograft obtained from tacrolimus-treated recipients had intact villi, and the infiltrate was minimal (C).

第2節 移植小腸におけるPEPT1の発現変動

移植小腸組織を経日的に採取しPEPT1及びSGLT1のmRNA発現量を拮抗PCR法を用いて検討した。同系移植を行ったラットではPEPT1及びSGLT1 mRNAの発現量は変化しなかった (Fig. III-2)。一方、異系移植を施した群では術後経日的にPEPT1及びSGLT1のmRNA量が低下した (Fig. III-3A)。タクロリムスを投与することによって、術後4日目におけるPEPT1 mRNAの発現量は、非投与群と比較して有意に高く、移植直前の提供小腸における発現量と同程度であった。しかしながら術後7日目にかけてPEPT1 mRNAは急激に低下しており、術後7日目での発現量はタクロリムス非投与群

と有意な差が認められなかった。またSGLT1 mRNAは異系移植において経日的に低下し、タクロリムスを投与しても顕著な回復は認められなかった (Fig. III-3B)。

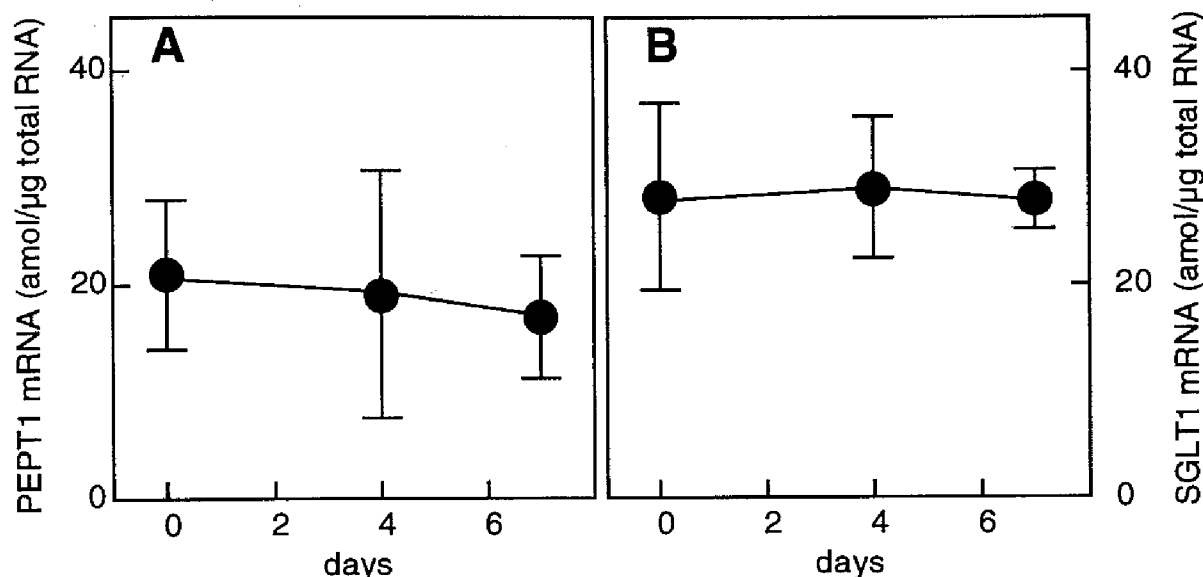


FIG. II-2. mRNA expression of PEPT1 (A) and SGLT1 (B) in the isografts. Total RNA was extracted from the isografts on day 0, day 4 and day 7. Extracted RNA was reverse-transcribed, and PEPT1 and SGLT1 mRNA were quantified by competitive PCR. Each point represents the mean \pm S.E. of 4 experiments.

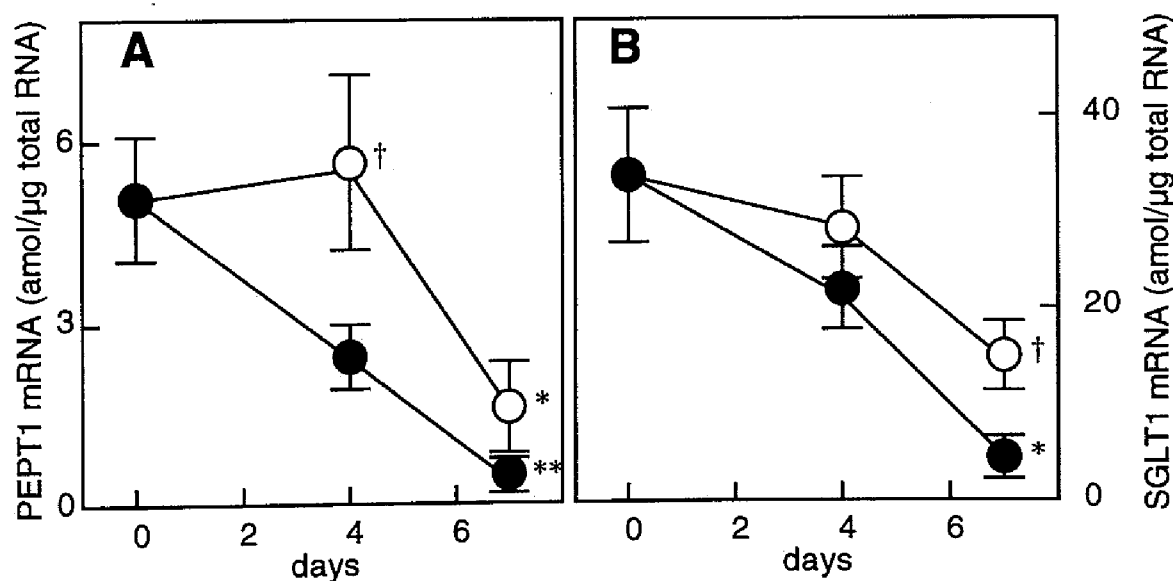


FIG. III-3. mRNA expression of PEPT1 (A) and SGLT1 (B) in the allografts. Total RNA was extracted from allografts with (○) or without (●) tacrolimus treatment on day 0, day 4 and day 7. Extracted RNA was reverse-transcribed and PEPT1 and SGLT1 mRNA were quantified by competitive PCR. Each point represents the mean \pm S.E. of 3-6 experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significant difference from the mRNA level on day 0. † $P < 0.05$, significant difference from tacrolimus-untreated group.

次にPEPT1及びSGLT1蛋白の発現量を検討するためウエスタンブロット解析を行った。異系移植モデルの7日目では Villin 蛋白が消失していたが、同系移植群及びタクロリムスを投与した異系移植群では Villin 蛋白の発現量は維持された (Fig. III-4C)。一方、PEPT1蛋白はタクロリムスを投与して免疫反応を抑制した異系移植小腸の7日目においても発現量が明らかに低下した (Fig. III-4A)。なおSGLT1蛋白は同系移植においても術後4日目以降低下しており (Fig. III-4B)、移植手術などの影響により発現量が低下したものと推察された。

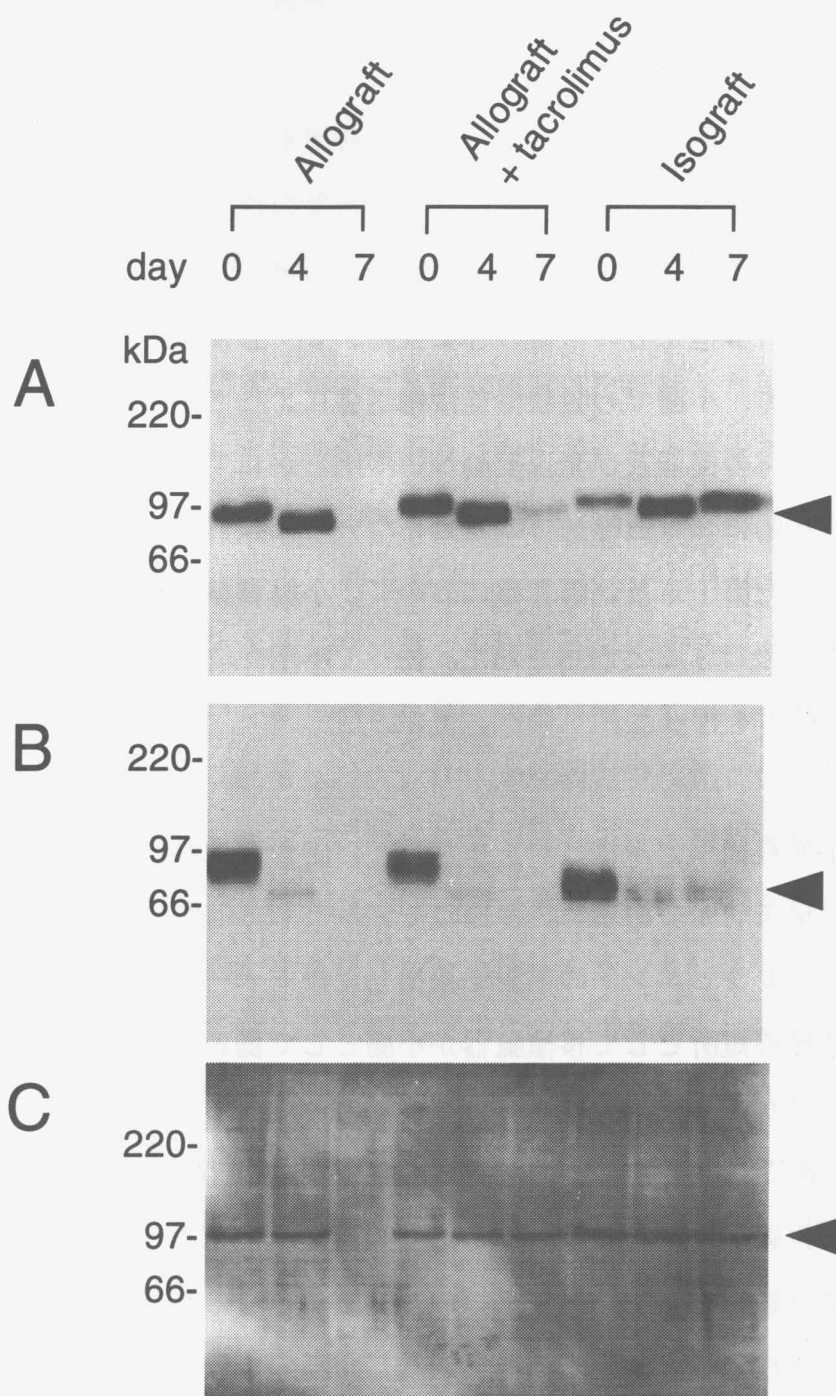


FIG. III-4 Western blot analysis of crude plasma membranes from transplanted intestine for PEPT1 (A), SGLT1 (B) and villin (C). Crude membranes (25 μ g) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (8%) and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. The antisera for PEPT1 and SGLT1 and goat anti-villin polyclonal IgG (1:1000 dilution) were used as primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-goat IgG antibodies were used for detection of bound antibodies. The arrowheads indicate the positions of each protein.

考 察

これまでに小腸移植後、拒絶反応が抑制された場合でも移植された小腸の機能が低下することが報告されてきた^{79, 80)}。移植医療において術後の移植臓器の機能保持は治療の成否に関わる重要な要素であるが、小腸移植患者では術後の評価法としては次の2つが主要なものである。1. 移植患者の術後の体重変動、2. 移植臓器の組織学的観察による拒絶反応の有無。一方、小腸での吸収機能は輸送体によって担われており、小腸機能を評価する際には輸送体の機能及び発現変動について明らかにする必要があるものと考えられる。しかし移植小腸における輸送体の変動については検討されておらず不明な点が多く残されていた。また第Ⅰ章及び第Ⅱ章において、小腸移植で用いられる免疫抑制剤が小腸PEPT1に影響を及ぼすことが示された。従って本章では移植小腸におけるPEPT1の発現変動について検討を行った。

本研究で用いた小腸移植モデルは、レシピエントの腸管を残したまま、小腸を移植するもので異所性の移植モデルである⁸¹⁾。移植のモデルとしては他に同所移植の手法も確立されており、これはレシピエントの小腸を摘出した後ドナーの小腸組織を移植するものである。異所性移植の短所として移植臓器が小腸として働いていないこと、ストーマを作るために感染症にかかりやすくなることなどがあげられる。一方、長所として移植小腸が拒絶などの影響により機能しなくても実験動物の栄養吸収能は影響を受けにくく、同所移植と比較して拒絶反応に対して耐性があり致死率が低いこと、実験動物を生かしたままストーマより経時的に生体標本を採取できることなどが上げられる。今回は拒絶反応時と免疫抑制剤投与により拒絶反応を回避した際の小腸輸送体の発現を検討するため、移植小腸機能に実験動物の生死が影響を受けにくい異所移植モデルを選択した。また異所移植モデルでは経日的にサンプルを回収できることから、経日的な輸送体発現の変動を検討する上で同所移植より有利であると考えた。しかし移植後、小腸としての役割を果たしていないことは、小腸機能を担う輸送体について検討する上で短所となる。

そこで拒絶の起こらない同系移植ラットを同時に作成し、これらの移植小腸での結果をコントロールとして比較検討した。

SGLT1蛋白の発現量は同系移植モデルラットでも術後4日目以降低下しており、これまでに報告されている同系移植小腸におけるグルコース輸送の低下を支持するものであった⁸²⁾。その要因として虚血再灌流等による傷害の影響が考えられ、またSGLT1は食事の栄養物質によっても発現変動を受けることが知られていることから⁸³⁾、異所移植では移植小腸に消化産物が通らないことが発現低下を惹起した可能性が考えられる。しかし消化産物が通過する同所性の移植小腸においてもグルコースの輸送能が低下することが示されており⁸²⁾、本章において示されたSGLT1の発現量低下は消化産物による影響以外の要因も考えられる。一方、同系移植においてPEPT1 mRNAは変化しておらず、またPEPT1蛋白は上昇傾向を示した。従ってPEPT1については小腸を異所移植することによる発現低下は生じないことが示された。異系移植モデルでは移植後7日目において拒絶反応により上皮組織は脱落した。これは上皮細胞の指標として用いられる Villin 蛋白の発現が7日目において完全に認められなくなることに相関する。従ってタクロリムスを投与しない異系移植におけるPEPT1の発現量減少は上皮細胞の消失によって引き起こされていると考えられる。タクロリムスを投与することにより拒絶反応を示す兆候は改善され、これは同様の手法により拒絶反応について検討したHayashiらの報告と一致する⁸⁴⁾。またVillin 蛋白の発現量もタクロリムス投与により維持され、従って拒絶反応は回避され上皮組織は維持されていると考えられる。しかしながらPEPT1のmRNA、蛋白ともに術後7日目における減少は回避されなかったことから、拒絶反応による小腸上皮細胞の脱落を回避してもPEPT1の発現低下が引き起こされることが明らかとなった。

本章において移植小腸におけるPEPT1の発現変動について検討した。拒絶反応の起こらない同系移植小腸においてはPEPT1の発現量は維持もしくは上昇傾向を示したが、拒絶反応を引き起こした移植小腸では上皮細胞の脱落と共にPEPT1の発現量が低下した。免疫抑制剤を投与することにより拒絶反応を抑制し、上皮組織が維持されてもPEPT1の

発現量は低下傾向を示した。従って拒絶反応を回避した移植小腸においてPEPT1の発現量が低下する可能性が示された。

結 論

以上3章にわたり、著者は小腸上皮細胞Caco-2及びラットを用いて免疫抑制剤によるPEPT1の機能・発現変動と移植小腸におけるPEPT1の発現変動について研究を行い、以下の結論を得た。

第Ⅰ章 ヒト由来培養腸上皮細胞Caco-2に発現するペプチド輸送体に及ぼす免疫抑制剤の影響

タクロリムス及びシクロスポリン処理により、頂側膜側から細胞内へのglycylsarcosine取り込みは薬物処理濃度に依存して減少したが、グルコース及びアラニンの取り込みには処理濃度に依存した取り込み活性の変化は認められなかった。速度論的解析の結果、glycylsarcosine取り込みの減少は最大輸送速度 (V_{max}) の低下に起因することが示唆されたが、PEPT1 mRNAの発現量に変化は認められなかった。そこで免疫抑制剤処理による細胞膜傷害について検討したところ、乳酸デヒドロゲナーゼの細胞外への漏出量は増加したが、頂側膜酵素であるアルカリホスファターゼや γ -グルタミルトランスフェラーゼの活性に変化は認められなかった。このことから免疫抑制剤は、頂側膜傷害を一部惹起しているものの、この傷害はすべての膜蛋白の機能を低下させるものではないことが示唆された。またglycylsarcosineの経細胞輸送量が免疫抑制剤処理によって低下しており、タクロリムス及びシクロスポリンが小腸上皮細胞の頂側膜を一部傷害しPEPT1の活性を低下させることで、ペプチド吸収能を低減させることが示唆された。

第Ⅱ章 ラット小腸ペプチド輸送体に及ぼす免疫抑制剤投与の影響

タクロリムス及びシクロスポリン投与を開始することにより餌の摂取量は減少したがタクロリムス投与群では投与9日目においてコントロール群と同程度まで回復した。またこれら免疫抑制剤投与により体重の増加が抑制され、コントロール群では13日間で約44 g体重が増加したものの両免疫抑制剤投与群では体重は増加しなかった。投与14日目に小腸組織中へのglycylsarcosine取り込みを検討したところ、シクロスポリン投与群の空腸でコントロール群と比較して約1.4倍の有意な上昇が認められ、速度論的解析から見かけの最大輸送速度 (V_{max}) の上昇に起因することが示唆された。そこでウエスタンブロット解析によりPEPT1蛋白の発現量について検討を行ったところ、PEPT1蛋白の発現量がタクロリムス及びシクロスポリン投与群で上昇していることが明らかとなった。しかしながらPEPT1蛋白の発現量変動がglycylsarcosine取り込み活性の変化よりも大きく、第I章でのCaco-2細胞における結果を考えあわせると、免疫抑制剤投与により小腸PEPT1の活性が低下するものの、PEPT1蛋白の発現量が増加することによって小腸における小分子ペプチドの吸収が維持されるものと推察された。

第III章 小腸移植ラットにおける小腸ペプチド輸送体の発現変動

移植手術等の影響を検討するため同系移植を行ったラットでは、移植組織の傷害は認められず、またPEPT1 mRNA量の変化も認められなかったが、移植後にPEPT1蛋白の発現量は上昇傾向を示した。一方、タクロリムスを投与しない異系移植ラットでは拒絶反応とともに上皮細胞が脱落し、PEPT1の発現量が低下することが判明した。異系移植ラットにタクロリムスを投与することにより拒絶反応は回避され小腸上皮細胞は維持されたが、PEPT1の発現量はmRNA及び蛋白共に低下傾向を示し、術後7日目ではタクロリムス非投与群と同程度であった。これらの結果から、同系移植小腸ではPEPT1の発現は維持されるものの、拒絶反応を回避した異系移植小腸においてはPEPT1の発現が低下することが明らかとなった。

以上、著者はタクロリムス及びシクロスポリンが小腸ペプチド輸送体の活性を低下させることを明らかにした。さらに正常な小腸組織では、免疫抑制剤投与後PEPT1の発現が誘導されペプチド輸送能は維持されるが、移植小腸ではPEPT1の発現は誘導されず低下することを示した。これらの結果より、他の臓器移植に比べ小腸移植ではペプチド輸送体の機能・発現低下が生じ易いことが示唆された。本研究成果は、小腸移植における術後栄養管理及び小腸の機能保全に対し有用な基礎的知見になると考える。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院 乾 賢一 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御指導と御助言を頂いた富山医科薬科大学大学院薬学研究科 橋本征也 教授、京都大学医学部附属病院 齋藤秀之 助教授、同 桂 敏也 助手、並びに同附属病院薬剤部諸氏に深謝致します。さらに小腸移植ラット作成にあたり御指導頂いた京都大学大学院医学研究科 田中紘一 教授、京都大学医学部附属病院 上本伸二 助教授に深謝致します。

実験の部

【試薬】

タクロリムスは藤沢薬品工業株式会社、シクロスポリンはNovartis社より供与されたものを用いた。 $[^{14}\text{C}]$ Glycylsarcosineは第一化学薬品、 $[^3\text{H}]$ glucoseはMoravek Biochemicals社、 $[^3\text{H}]$ alanineはAmersham社のものを用いた。Glycylleucineはペプチド研究所のものを用いその他の試薬は市販品特級を用いた。

第 I 章 実験の部

【1-1】 Caco-2細胞におけるPEPT1の同定

[a] アフリカツメガエル卵母細胞発現系によるPEPT1の取り込み活性

アフリカツメガエル（浜松生物教材）を氷中に静置することにより麻酔し、氷上にて開腹した。卵塊を取り出してMBS緩衝液（modified Barth's solution; 88 mM NaCl、1 mM KCl、2.4 mM NaHCO_3 、0.82 mM MgSO_4 、0.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、0.41 mM CaCl_2 、10 mg/l penicilin、10 mg/l streptomycin、pH7.5）中で卵胞を開き、0.4%コラゲナーゼ（type IA、Sigma社）含有MBSで室温1時間処理した。卵塊を数回MBS緩衝液で洗浄し、卵胞から遊離した卵母細胞を回収した。得られた卵母細胞はMBS緩衝液中で18℃、一晩静置した。

14日間培養したCaco-2細胞からチオシアン酸グアニジン法⁸⁵⁾によってtotal RNAを精製し、oligo (dT)-celluloseクロマトグラフィーを用いてpoly(A)⁺RNAを分離精製した⁸⁶⁾。poly(A)⁺RNAをSuperScript II Reverse Transcriptase（GIBCO社）を用いて逆転写し、first-strand cDNAを合成した。このcDNAを鋳型として特異的なプライマー（Sense primer 5'-CAGATCTGCCGCCATGGGAATGTCCAAATCACAC-3'、Antisense primer

5'-CAGATCTCCTTCACATCTGTTTCTGTGAATTGGC-3')を用いてPCRによりPEPT1の全長を増幅した。PCR反応はTaq DNA polymerase (宝酒造) を用い、変性 (94℃、1分)、アニーリング (55℃、1分)、伸長反応 (72℃、2分) を1サイクルとして30サイクル行った。得られたPCR産物をpXβG vector (Dr. P. Agreより供与された) にサブクローニングした後、ABI377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems社) を用い塩基配列を確認した。制限酵素Not Iにより切断し直鎖化したプラスミドを鋳型として、T7ポリメラーゼ (Promega社) により合成RNAを作成した。合成したPEPT1 RNAをマイクロインジェクターを用いて調製済みの卵母細胞に注入し、卵母細胞はMBS中で18℃、1日間インキュベート後、取り込み実験に用いた。取り込み実験は1.5 mlチューブに3-4個の卵母細胞を用いて行った。基質を含むUptake buffer (100 mM NaCl、2 mM KCl、1mM MgCl₂、10 mM MES (pH 5.0-6.5) or TRIS (pH 7.0-7.5)) 中で卵母細胞を2時間インキュベートし、氷冷Bufferで卵母細胞を3回洗浄する事で反応を停止させた。卵母細胞中に取り込まれた放射活性は卵母細胞を10% SDSで溶解した後、ACSH (Amersham社) を用いて液体シンチレーション法により測定した。

[b] Caco-2細胞へのglycylsarcosine取り込み実験

Caco-2細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC) より入手したものを用いた²⁶⁾。抗生物質非存在下、10%牛胎児血清及び1%非必須アミノ酸を含むDMEMを用いCO₂インキュベータ内で単層培養し、通常7日ごとに0.05%トリプシン-0.02%EDTAを用いて細胞を剥離させ継代した。実験に用いた細胞は35 mm のプラスチックディッシュ上に20×10⁴ cells/dish となるように播種し、3-4日ごとに液体培地を交換しながら14日間培養した。取り込み実験は基質を含むIncubation medium (145 mM NaCl、3 mM KCl、1mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂、5mM D-glucose、5 mM MES (pH 5.0-6.0) or HEPES (pH 6.5-7.4)) でCaco-2細胞をインキュベーションすることで行い、氷冷したIncubation medium 5 mlで2回洗浄する事で反応を停止させた。洗浄後の細胞は0.5 mlの1N NaOH液中に溶解しACSH (Amersham社) を用いて放射活性を測定した。

[c] ノーザンブロット解析

Caco-2細胞からのpoly(A)⁺RNA精製は実験の部第I章【1-1】 [a]と同様に行った。poly(A)⁺RNAをホルムアミド含有変性アガロースゲル（1%）電気泳動によって分離し、これをナイロン膜にトランスファーした。PEPT1特異的な配列を元にランダムプライム法⁸⁶⁾により[α-³²P] dCTPで標識したプローブを作成し、ナイロン膜とハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは42℃で16時間、50%ホルムアミド、5×SSPE、5×Denhardt's solution、0.2% SDS、25 μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中で行った。洗浄によってメンブレンの非特異的バックグラウンドを取り除いた後、X線フィルムに感光させバンドを検出した。

【1-2】 Caco-2細胞におけるglycylsarcosine取り込み及び輸送実験

[a] Caco-2細胞の培養

Dish上でのCaco-2細胞の培養は実験の部第I章【1-1】 [b]と同様に行った。培養14日目にタクロリムス及びシクロスポリンを含む液体培地と交換し、免疫抑制剤による処理を行った。Transwell®（Coster社）上に培養する場合は 6.37×10^4 cells/cm²となるように播種し、液体培地の交換は2-4日ごとに行った。培養14日目にTranswellチャンバーの内側、外側両方の液体培地をタクロリムス及びシクロスポリンを含む液体培地と交換し、免疫抑制剤による1日間処理をおこなった。

[b] グリシルサルコシンの取り込み及び経細胞輸送実験

免疫抑制剤で処理した後Incubation mediumで洗浄し、glycylsarcosine取り込み実験を行った。取り込み実験は実験の部第I章【1-1】 [b]と同様に行った。経細胞輸送実験は免疫抑制剤処理後の細胞を1回洗浄した後、頂側膜側チャンバーに基質を含んだIncubation mediumを、側底膜側には基質を含まないIncubation mediumを加え、側底膜側のIncubation mediumを経時的に採取し放射活性を測定することで行った。60

min のインキュベーション後頂側膜及び側底膜の両側より氷冷したIncubation mediumで2回洗浄し輸送実験を終了した。フィルター上の細胞は0.5 ml NaOH中に溶解し、液体シンチレーションカウンターで細胞内に蓄積した放射活性を計測した

[c] 蛋白定量

牛 γ -globulinを標準物質としてBradford⁸⁷⁾の方法に準じてBio-Rad Protein Assay Kitを用いて定量を行った。

【1-3】 ヒトPEPT1 mRNAの定量

RNeasy Mini kit (Qiagen社) を用いてタクロリムス及びシクロスポリンで処理したCaco-2細胞よりtotal RNAを精製し、得られたRNAはDNA分解酵素DNase Iで37℃、30分間処理した。拮抗PCRはSiebertとLarrickによって確立された方法に従って行った⁸⁸⁾。Competiter DNAは小林らの方法に従い^{89, 90)}、以下のようにして確立した。すなわちPEPT1及びv-erbB retrovirus cDNA fragmentに特異的なプライマーを用いてv-erbB retrovirus cDNA frgagment (宝酒造) の両端にPEPT1の配列を持つPCR産物を増幅した。PCR産物をpCR-Script SK(+) plasmid vectorにサブクローニングし、ABI373A DNA sequencer (PE Applied Biosystems社) を用いて塩基配列を確認した後、competiter DNAとした。1 μ g total RNAをSuperScript II Reverse Transcriptase (GIBCO社) を用いて20 μ lの反応液中で逆転写反応をおこなった。得られた反応液を10倍に希釈し全量を200 μ lとした後、反応液5 μ lを1-250 zmolのcompetiter DNA共存下でTaq DNA polymerase (宝酒造) を用いてPCRを行った。PCR反応は、変性 (94℃、1分)、アニーリング (65℃、1分)、伸長反応 (72℃、1分) を1サイクルとして35サイクル行った。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動した後、電気泳動像を画像解析しそれぞれのmRNAの初濃度を決定した。なお内部標準としGAPDHのmRNA量も同様の手法を用いて測定し補正に用いた。PEPT1及びGAPDHに特異的なprimerをTable I-2に示す。

TABLE I-2 Nucleotide sequences of PCR primers used in competitive PCR analysis for human

Primers		Positions ¹
<i>for PEPT1</i>		
Sense	5'-CTGCAAATCCCGCAGTATTTTCTT-3'	1803-1826
Antisense	5'-CATCTGTTTCTGTGAATTGGCCCC-3'	2157-2186
<i>for GAPDH</i>		
Sense	5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'	212-235
Antisense	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'	786-809

¹From the GenBank database

【1-4】膜傷害の評価

[a] アルカリフォスファターゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼの活性測定

リン酸緩衝液で細胞を洗浄した後、リン酸緩衝液中で細胞を超音波破碎し、試料とした。培養液中へのLDHの遊離量を定量するため培養液は回収し、3000 rpmで遠心したのち上清中のLDH活性を測定した。それぞれの酵素活性の測定は次のように行った^{91, 92)}。

[アルカリフォスファターゼ] p-nitrophenyl phosphateを含む基質溶液中に試料を加え37℃、15分間インキュベートした。0.6NのNaOH溶液を加えることで反応を停止させ、3000 rpmで10分間遠心した後、上清の410 nmにおける吸光度を測定した。

[γ -グルタミルトランスフェラーゼ] γ -glutamyl-p-nitroanilideを含む基質溶液に試料を加え37℃、15分間インキュベートした。1.5 M酢酸で反応を停止させた後410 nmにおける吸光度を測定した。

〔乳酸デヒドロゲナーゼ〕 β -nicotinamide adenine dinucleotideを含む基質溶液に試料を加え340 nmにおける吸光度の増加を経時的に測定した。

[b] 蛋白定量

実験の部第Ⅰ章【1-3】 [c]と同様に行った。

第Ⅱ章 実験の部

【2-1】 実験動物

体重270-290 gのルイス系雄性ラット（清水実験材料株式会社）を用いた。ラットは個別にステンレス製の代謝ゲージ内で飼育し、自由に固形飼料と水を摂取させた。タクロリムスは5 mg/kg/2 days、シクロスポリンは30 mg/kg/2 daysを14日間皮下投与した。コントロール群には基剤であるエタノール35%、クレモフォール65%の混液を投与した。餌の摂取量と体重は2日に1度測定した。

【2-2】 臨床パラメータの測定

免疫抑制剤投与終了後、ペントバルビタール麻酔下（50 mg/kg、Nembutal、Abbot Laboratories社）、開腹し全採血を行った。得られた血液サンプルよりクリニカルアナライザー（i-STAT社）を用いて血中臨床パラメータを測定した。

【2-3】 反転腸管法による小腸PEPT1の活性評価

[a] 反転腸管の調製

全採血後直ちに空腸及び回腸を摘出した。摘出した腸管は反転させたのち外径4 mmのポリエチレンチューブに固定した^{93, 94)}。その後5-10 mmの切片に分割し、取り込み実験に用いた。

[b] 反転腸管へのglycylsarcosine取り込み実験

反転腸管はIncubation buffer (129 mM NaCl、5.1 mM KCl、1.4 mM CaCl₂、1.3 mM KH₂PO₄、1.3 mM MgSO₄ (pH 6.5)) 中で5分間インキュベートした後、100% 酸素下基質を含むIncubation buffer中でインキュベートした。氷冷Bufferで2回洗浄することで反応を停止させ、0.5 ml NCS II 中で溶解し組織中の放射活性を液体シンチレーション法により測定した。

【2-4】 PEPT1の発現量の評価

[a] ウェスタンブロット解析によるPEPT1蛋白発現量の測定

抗rat PEPT1抗体はラットPEPT1のC末15残基を抗原として作成し⁹⁾、抗ラットSGLT1抗体は帝京大学の笠原教授より供与されたものを用いた⁹⁵⁾。抗Villinポリクローナル抗体は米国 Santa Cruz社のものを用いた。

ラット小腸のcrude membraneは以下のように調整した。それぞれの小腸組織をホモジナイズバッファー (0.23 M sucrose、2mM EDTA、1% protease inhibitor cocktail III (Cabiochem社)、5mM Tris (pH 7.5)) 中でホモジナイズした。ホモジナイズされたサンプルは3000×gで15分間遠心し、得られた上清をさらに10000×gで30分間遠心した。最終的に得られたペレットを小腸膜画分とした。

レーンあたり 20 μgの膜サンプルをSDS-PAGEにより分離した後、PVDF膜 (Immobilon社) に電気ブロットにより転写した。膜は5%ドライミルク存在下TBSTバッファー (20 mM Tris、137 mM NaCl、0.1% Tween 20) 中でブロッキングを行った。ブロッキング後抗PEPT1抗血清及び抗SGLT1抗血清、抗Villinポリクローナル抗体存在化で処理した。結合した抗体はHRP標識した2次抗体を用い化学発色法 (Amersham社) により検出した。

[b] Real-time PCRによるPEPT1 mRNAの定量

小腸total RNAの精製と逆転写反応は実験の部第I章【1-3】と同様に行った。PEPT1 mRNA量はABI 7700 Sequence Detector System (PE Applied Biosystems社)

を用いTwo-step RT-PCR assay により定量した。Real-time PCRは以下の通り行った。1 μ M Forward primer 及びReverse primer、0.2 μ M TaqMan probe を含む反応液をPCRした。PCR反応は、変性（95℃、15秒）、アニーリング及び伸長反応（60℃、90秒）を1サイクルとして40サイクル行った。Real-time PCRに用いたプライマー及びプローブをTable II-2に示す。検量線は既知濃度のplasmidを作成しスタンダードとした。スタンダード用プラスミドDNAはPEPT1の1848-1930bpの配列をPCRにより増幅し、pCR-Script(+)-SK plasmid vector（stratagene社）にサブクローニングすることにより作成した。定量化は7700 ABI PRISM sequence detector systemのsoftware上で行った。なおRodent GAPDH control Reagent（PE Applied Biosystems社）のキットを用いてGAPDH mRNA量も定量し内部標準として用いた。

Table II-2 Nucleotide sequences of PCR primers and TaqMan probe for rat

PEPT1 used in real-time PCR

	Position ^a	Sequence
Forward primer	1848-1872	CTTCTCTGTCACAGGACTGGAGTTC
Reverse primer	1910-1930	TTAGAAGCCATCCTGCCTGAA
TaqMan probe	1875-1905	CTATTCCCAGGCCCCGTCTAACATGAAGTC

^aFrom the GenBank database

第Ⅲ章 実験の部

【3-1】小腸移植ラットの作成

[a] 実験動物

ルイス系雄性ラット（清水実験材料株式会社）をレシピエントとドナーとして、ブラウンノルウェーラット（清水実験材料株式会社）をドナーとして用いた。すべてのラットは自由に餌と水を摂取させた。異所性移植手術は以下のように行った⁹⁶⁾。

[b] 移植手術

ドナーの空腸をトライツ靱帯から下30cmを腸管膜動脈と門脈静脈を含む状態で摘出し、腸管膜動脈を腎大動脈に、門脈静脈を腎大静脈にそれぞれ吻合した⁹⁶⁾。移植した腸管の両端はストーマとし、生体標本は移植直前、移植後4日及び7日目に採取した。

[c] 実験群

3種の移植モデルを作成した。1. 異系移植：レシピエントにルイスラット、ドナーにブラウンノルウェーラットを用いた。2. 異系移植+タクロリムス投与：レシピエントにルイスラットを、ドナーにブラウンノルウェーラットを用いた。移植直前と移植後毎日タクロリムス1mg/kgを経口投与した。3. 同系移植：レシピエント及びドナーともにルイスラットを用いた。

【3-2】組織学的解析による拒絶反応の評価

組織学的検討に用いたサンプルは小腸より切り出しパラフィン包埋した。4 μ mの厚さにスライスし、ヘマトキシリン-エオシン染色し、顕微鏡下で観察した。

【3-3】PEPT1の発現変動の評価

[a] Total RNAの抽出

小腸組織のRNAの抽出はTRIZOL（GIBCO社）を用いて行った。得られたRNAはDNase Iで37℃、30分間処理しゲノムDNAのコンタミを回避した。

[b] 拮抗PCR

拮抗PCRは実験の部第Ⅰ章【1-3】と同様の方法で行った。拮抗PCRに用いたプライマー及び標的配列をTable III-1に示す。

[c] 抗体及びウエスタンブロット解析

小腸膜の調製及びウエスタンブロット解析は実験の部第Ⅱ章【2-4】 [a] と同様に行った。

TABLE III-1 Nucleotide sequences of PCR primers used in competitive PCR analysis for rat

Primers		Positions ¹
<i>for PEPT1</i>		
Sense	5' -GTGTGGGGCCCCAATCTATAACCGT-3'	1442-1465
Antisense	5' -GTTTGTCTGTGAGACAGGTTCCAA-3'	2153-2176
<i>for SGLT1</i>		
Sense	5' -ATGGACAGTAGCACCTTGAGCC-3'	170-191
Antisense	5' -TAGCCCCAGAGAAGATGTCTGC-3'	647-668
<i>for GAPDH</i>		
Sense	5' -CCTTCATTGACCTCAACTAC-3'	131-150
Antisense	5' -GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'	705-724

¹From the GenBank database

論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Cloning and characterization of a pH-sensing regulatory factor that modulates transport activity of the human H⁺/peptide cotransporter, PEPT1

Biochemical and Biophysical Research Communication **237**: 577-582, 1997.

Effects of tacrolimus and cyclosporin A on peptide transporter PEPT1 in Caco-2 cells

Pharmaceutical Research, in press

Effects of tacrolimus and cyclosporin A on the rat intestinal peptide transporter PEPT1

Submitted

Expression of peptide transporter following intestinal transplantation in the rat

Submitted

引用文献

1. 星 猛 (訳), 消化と吸収. 市岡正道, 星 猛, 林 秀生, 管野富夫, 中村嘉男, 佐藤昭夫, 熊田 衛 (共訳) 医科生理学展望 pp467-pp477, 丸善株式会社, 東京, 1994.
2. Matthews, D.M. Intestinal absorption of peptides. *Physiol. Rev.* **55**: 537-608, 1975.
3. Nixon, S.E. and Mawer, G.E. The digestion and absorption of protein in man. 2. The form in which digested protein is absorbed. *Br. J. Nutr.* **24**: 241-258, 1970.
4. Adibi, S.A. and Mercer, D.W. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J. Clin. Invest.* **52**: 1586-1594, 1973.
5. Chung, Y.C., Kim, Y.S., Shadchehr, A., Garrido, A., Macgregor, I.L. and Sleisenger, M.H. Protein digestion and absorption in human small intestine. *Gastroenterology* **76**: 1415-1421, 1979.
6. Adibi, S.A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* **113**: 332-340, 1997.
7. Fei, Y.J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Romero, M.F., Singh, S.K., Boron, W.F. and Hediger, M.A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* **368**: 563-566, 1994.
8. Liang, R., Fei, Y.J., Prasad, P.D., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T.L., Hediger, M.A., Ganapathy, V. and Leibach, F.H. Human intestinal H^+ /peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **270**: 6456-6463, 1995.
9. Saito, H., Okuda, M., Terada, T., Sasaki, S. and Inui, K. Cloning and characterization of a rat H^+ /peptide cotransporter mediating absorption of β -lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 1631-1637, 1995.

10. Fei, Y.J., Sugawara, M., Liu, J.C., Li, H.W., Ganapathy, V., Ganapathy, M.E. and Leibach, F.H. cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim. Biophys. Acta* **1492**: 145-154, 2000.
11. Leibach, F.H. and Ganapathy, V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 99-119, 1996.
12. 乾 賢一, H^+ /ペプチドトランスポータ. 腎と透析 **44**: 252-256, 1998.
13. 寺田智祐, 乾 賢一, アミノ酸・ペプチド輸送体. 腎と透析 **45** (1998 増刊号) : 238-242, 1998.
14. Inui, K. and Terada, T. Dipeptide transporters. Amidon, G.L. and Sadee, W. (Eds) *In Membrane Transporters as Drug Targets* pp.269-pp.288, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
15. 寺田智祐, ペプチドトランスポータを介した薬物輸送の分子機構. 膜 (MEMBRANE) **25**: 220-225, 2000.
16. Kahan, B.D. Cyclosporine. *New. Engl. J. Med.* **321**: 1725-1738, 1989.
17. Shapiro, R., Fung, J.J., Jain, A.B., Parks, P., Todo, S. and Starzl, T.E. The side effects of FK 506 in humans. *Transplant. Proc.* **22**: 35-36, 1990.
18. Fisher, A., Schwartz, M., Mor, E., Sheiner, P., Emre, S., Guy, S. and Miller, C. Gastrointestinal toxicity associated with FK 506 in liver transplant recipients. *Transplant. Proc.* **26**: 3106-3107, 1994.
19. Sigalet, D.L., Kneteman, N.M. and Thomson, A.B.R. Reduction of nutrient absorption in normal rats by cyclosporine. *Transplantation* **53**: 1103-1107, 1992.
20. Madsen, K.L., Yanchar, N.L., Sigalet, D.L., Riegel, T. and Fedorak, R.N. FK506 increases permeability in rat intestine by inhibiting mitochondrial function. *Gastroenterology* **109**: 107-114, 1995.
21. Yanchar, N.L., Riegel, T.M., Martin, G., Fedorak, R.N., Kneteman, N.M. and Sigalet, D.L. Tacrolimus (FK506)-its effects on intestinal glucose transport. *Transplantation* **61**: 630-634,

1996.

22. Gabe, S.M., Bjarnason, I., Tolou-ghamari, Z., Tredger, J.M., Johnson, P.G., Barclay, G.R., Williams, R. and Silk, D.B.A. The effect of tacrolimus (FK506) on intestinal barrier function and cellular energy production in humans. *Gastroenterology* **115**: 67-74, 1998.
23. Tzakis, A.G., Todo, S. and Starzl, T.E. Intestinal transplantation. *Annu. Rev. Med.* **45**: 79-91, 1994.
24. Uemoto, S., Fujimoto, Y., Inomata, Y., Egawa, H., Asonuma, K., Pollard, S. and Tanaka, K. Living-related small bowel transplantation: the first case in Japan. *Pediatr. Transplant.* **2**: 40-44, 1998.
25. Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A. and Marxer, A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolase in human intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **101**: 838-851, 1985.
26. Inui, K., Yamamoto, M. and Saito, H. Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**: 195-201, 1992.
27. Saito, H. and Inui, K. Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* **265**: G289-294, 1993.
28. Thwaites, D.T., Brown, C.D.A., Hirst, B.H. and Simmons, N.L. H⁺-coupled dipeptide (glycylsarcosine) transport across apical and basal borders of human intestinal Caco-2 cell monolayers display distinctive characteristics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1151**: 237-245, 1993.
29. Thwaites, D.T., Brown, C.D.A., Hirst, B.H. and Simmons, N.L. Transepithelial glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H⁺-coupled carriers at both apical and basal membranes. *J. Biol. Chem.* **268**: 7640-7642, 1993.
30. Matsumoto, S., Saito, H. and Inui, K. Transcellular transport of oral cephalosporins in human intestinal epithelial cells, Caco-2: interaction with dipeptide transport systems in apical and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 498-504, 1994.

31. Mahraoui, L., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A., Rousset, M. and Brot-Laroche, E. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J.* **298**: 629-633, 1994.
32. Bissonnette, P., Gagné, H., Coady, M.J., Benabdallah, K., Lapointe, J.Y. and Berteloot, A. Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.* **270**: G833-843, 1996.
33. Thwaites, D.T., McEwan, G.T., Brown, C.D.A., Hirst, B.H. and Simmons, N.L. Na⁺-independent, H⁺-coupled transepithelial β -alanine absorption by human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Biol. Chem.* **268**: 18438-18441, 1993.
34. Thwaites, D.T., McEwan, G.T., Brown, C.D.A., Hirst, B.H. and Simmons, N.L. L-alanine absorption in human intestinal Caco-2 cells driven by the proton electrochemical gradient. *J. Membr. Biol.* **140**: 143-151, 1994.
35. Kekuda, R., Torres-Zamorano, V., Fei, Y.J., Prasad, P.D., Li, H.W., Mader, L.D., Leibach, F.H. and Ganapathy, V. Molecular and functional characterization of intestinal Na⁺-dependent neutral amino acid transporter B⁰. *Am. J. Physiol.* **272**: G1463-1472, 1997.
36. Mordrelle, A., Jullian, E., Costa, C., Cornet-Boyaka, E., Benamouzig, R., Tome, D. and Huneau, J.F. EAAT1 is involved in transport of L-glutamate during differentiation of the Caco-2 cell line. *Am. J. Physiol.* **279**: G366-373, 2000.
37. Mohrmann, I., Mohrmann, M., Biber, J. and Murer, H. Sodium-dependent transport of Pi by an established intestinal epithelial cell line (CaCo-2). *Am. J. Physiol.* **250**: G323-330, 1986.
38. Hidalgo, I.J. and Borchardt, R.T. Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1035**: 97-103, 1990.
39. Le Bivic, A., Quaroni, A., Nichols, B. and Rodriguez-Boulan, E. Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J. Cell. Biol.* **111**: 1351-1361, 1990.

40. Smith, T.K., Gibson, C.L., Howlin, B.J. and Pratt, J.M. Active transport of amino acids by gamma-glutamyl transpeptidase through Caco-2 cell monolayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 1028-1035, 1991.
41. Danpure, C.J. Lactate dehydrogenase and cell injury. *Cell. Biochem. Funt.* **2**: 144-148, 1984.
42. Deppe, C.E., Heering, P.J., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Grabensee, B. and Kinne, R.K. Effect of cyclosporine A on Na^+/K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter, and H^+/K^+ -ATPase in MDCK cells and two subtypes, C7 and C11. *Exp. Nephrol.* **5**: 471-480, 1997.
43. Atta, M.G., Dahl, S.C., Kwon, H.M. and Handler, J.S. Tyrosine kinase inhibitors and immunosuppressants perturb the myo-inositol but not the betaine cotransporter in isotonic and hypertonic MDCK cells. *Kidney Int.* **55**: 956-962, 1999.
44. Keelan, M., Wierzbicki, E., Sigalet, D., Kneteman, N., Clandinin, M.T. and Thomson, A.B.R. Alteration of intestinal brush border membrane lipid composition in rats by cyclosporine. *Transplantation* **56**: 1560-1564, 1993.
45. Galán, A.I., Muñoz, M.E. and Jiménez, R. S-Adenosylmethionine protects against cyclosporin A-induced alterations in rat liver plasma membrane fluidity and functions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**: 774-781, 1999.
46. Lee, H.J., Balasubramanian, S.V., Murer, H., Biber, J. and Morris, M.E. Modulation of sulfate renal transport by alterations in cell membrane fluidity. *J. Pharm. Sci.* **88**: 976-980, 1999.
47. Friedlander, G., Shahedi, M., Le Grimellec, C. and Amiel, C. Increase in membrane fluidity and opening of tight junctions have similar effects on sodium-coupled uptakes in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 11183-11188, 1988.
48. Nabekura, T., Takano, M. and Inui, K. Effects of benzyl alcohol on organic ion transport in rat renal basolateral membranes. *Pharm. Sci.* **2**: 415-417, 1996.
49. Nabekura, T., Takano, M. and Inui, K. Cholesterol modulates organic cation transport activity and lipid fluidity in rat renal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1283**:

232-236, 1996.

50. Nabekura, T., Takano, M., Kimura, M., Yasuhara, M. and Inui, K. Modulation of organic cation transport and lipid fluidity by benzyl alcohol in rat renal brush-border membranes. *Pharm. Res.* **13**: 1069-1072, 1996.
51. 田村康一, タクロリムスとシクロスポリンA. *蛋白質 核酸 酵素* **43**: 1118-1130. 1998.
52. Fujita, T., Majikawa, Y., Umehisa, S., Okada, N., Yamamoto, A., Ganapathy, V. and Leibach, F.H. σ Receptor ligand-induced up-regulation of the H^+ /peptide transporter PEPT1 in the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 242-246, 1999.
53. Thamocharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X. and Adibi, S.A. Hormonal regulation of oligopeptide transporter pept-1 in a human intestinal cell line. *Am. J. Physiol.* **276**: C821-826, 1999.
54. Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Leibach, F.H. Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/ H^+ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.* **299**: 253-260, 1994.
55. Muller, U., Brandish, M., Prasad, P.D., Fei, Y.-J., Ganapathy, V. and Leibach, F.H. Inhibition of the H^+ /peptide cotransporter in the human intestinal cell line caco-2 by cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**: 461-465, 1996.
56. Brandsch, M., Ganapathy, V. and Leibach, F.H. H^+ -peptide cotransport in Madin-Darby canine kidney cells: expression and calmodulin-dependent regulation. *Am. J. Physiol.* **268**: F391-397, 1995.
57. Terada, T., Sawada, K., Saito, H., Hashimoto, Y. and Inui, K. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.* **276**: G1435-1441, 1999.
58. Addison, J.M., Burston, D. and Matthews, D.M. Evidence for active transport of the dipeptide glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro. *Clin. Sci.* **43**: 907-911, 1972.

59. Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Leibach, F.H. Proton gradient-coupled uphill transport of glycylsarcosine in rabbit renal brush-border membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**: 946-953, 1985.
60. Yoshida, A., Takata, K., Kasahara, T., Aoyagi, T., Saito, S. and Hirano, H. Immunohistochemical localization of Na⁺-dependent glucose transporter in the rat digestive tract. *Histochem. J.* **27**: 420-426, 1995.
61. Ogihara, H., Suzuki, T., Nagamachi, Y., Inui, K. and Takata, K. Peptide transporter in the rat small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids. *Histochem. J.* **31**: 169-174, 1999.
62. Thamotharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X. and Adibi, S.A. Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) after a brief fast. *Metabolism* **48**: 681-684, 1999.
63. Ihara, T., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y. and Bamba, T. Regulation of PepT1 peptide transporter expression in the rat small intestine under malnourished conditions. *Digestion* **61**: 59-67, 2000.
64. Shiraga, T., Miyamoto, K., Tanaka, H., Yamamoto, H., Taketani, Y., Morita, K., Tamai, I., Tsuji, A. and Takeda, E. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology* **116**: 354-362, 1999.
65. Thamotharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X. and Adibi, S.A. Mechanism of dipeptide stimulation of its own transport in a human intestinal cell line. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **110**: 361-368, 1998.
66. Walker, D., Thwaites, D.T., Simmons, N.L., Gilbert, H.J. and Hirst, B.H. Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J. Physiol. (London)* **507**: 697-706, 1998.
67. Adibi, S.A., Fogel, M.R. and Agrawal, R.M. Comparison of free amino acid and dipeptide absorption in the jejunum of sprue patients. *Gastroenterology* **67**: 586-591, 1974.
68. Silk, D.B., Kumar, P.J., Perrett, D., Clark, M.L. and Dawson, A.M. Amino acid and peptide

- absorption in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut* **15**: 1-8, 1974.
69. Fogel, M.R., Ravitch, M.M. and Adibi, S.A. Absorptive and digestive function of the jejunum after jejunoileal bypass for treatment of human obesity. *Gastroenterology* **71**: 729-733, 1976.
 70. Tanaka, H., Miyamoto, K., Morita, K., Haga, H., Segawa, H., Shiraga, T., Fujioka, A., Kouda, T., Taketani, Y., Hisano, S., Fukui, Y., Kitagawa, K. and Takeda, E. Regulation of the PepT1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury. *Gastroenterology* **114**: 714-723, 1998.
 71. Massicot, F., Martin, C., Dutertre-Catella, H., Ellouk-Achard, S., Pham-Huy, C., Thevenin, M., Rucay, P., Warnet, J.M. and Claude, J.R. Modulation of energy status and cytotoxicity induced by FK506 and cyclosporin A in a renal epithelial cell line. *Arch Toxicol* **71**: 529-531, 1997.
 72. Sipka, S., Szücs, K., Szántó, S., Kovács, I., Lakos, G., Antal-Szalmás, P., Szegedi, G. and Gergely, P. Inhibition of calcineurin activity and protection against cyclosporine A induced cytotoxicity by prednisolone sodium succinate in human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* **48**: 87-92, 2000.
 73. Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Barcelo, P., Casado, F.J., Ballarin, J. and Pastor-Anglada, M. Effects of cyclosporine A on Na,K-ATPase expression in the renal epithelial cell line NBL-1. *Kidney Int.* **50**: 1483-1489, 1996.
 74. Khayat, Z.A., McCall, A.L. and Klip, A. Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand: increased protein half-life. *Biochem. J.* **333**: 713-718, 1998.
 75. Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R. and Komano, T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**: 6077-6080, 1993.
 76. Trezise, A.E.O., Romano, P.R., Gill, D.R., Hyde, S.C., Sepúlveda, F.V., Buchwald, M. and Higgins, C.F. The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *EMBO J.* **11**: 4291-4303, 1992.

77. Yumoto, R., Murakami, T., Nakamoto, Y., Hasegawa, R., Nagai, J. and Takano, M. Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**: 149-155, 1999.
78. Fricker, G., Drewe, J., Huwyler, J., Gutmann, H. and Beglinger, C. Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 1841-1847, 1996.
79. Kirkman, R.L., Lear, P.A., Madara, J.L. and Tilney, N.L. Small intestine transplantation in the rat-immunology and function. *Surgery* **96**: 280-287, 1984.
80. Watson, A.J.M., Lear, P.A., Montgomery, A., Elliott, E., Dacre, J., Farthing, M.J.G. and Wood, R.F.M. Water, electrolyte, glucose, and glycine absorption in rat small intestinal transplants. *Gastroenterology* **94**: 863-869, 1988.
81. Schroeder, P., Gundlach, M., Schweizer, E. and Deltz, E. Small bowel transplantation. *Microsurgery* **11**: 296-299, 1990.
82. Sigalet, D.L., Kneteman, N.N., Fedorak, R.N., Kizilisik, T., Madsen, K.E. and Thomson, A.B.R. Small intestinal function following syngeneic transplantation in the rat. *J. Surg. Res.* **61**: 379-384, 1996.
83. Hediger, M.A. and Rhoads, D.B. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* **74**: 993-1026, 1994.
84. Hayashi, M., Martinez, O.M., Krams, S.M., Burns, W. and Esquivel, C.O. Characterization of allograft rejection in an experimental model of small intestinal transplantation. *J. Gastrointest. Surg.* **2**: 325-332, 1998.
85. Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299, 1979.
86. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. Extraction, purification, and analysis of messenger

- RNA from eukaryotic cells. In *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed. pp.7.26-pp.7.29, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
87. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254, 1976.
 88. Siebert, P.D. and Larrick, J.W. Competitive PCR. *Nature* **359**: 557-558, 1992.
 89. Kobayashi, H., Takemura, Y., Miyachi, H., Kawabata, M., Mori, S., Kawai, Y., Furihata, K., Sekiguchi, S. and Watanabe, K. Quantitative analysis of human multidrug resistance 1 (MDR1) gene expression by nonisotopic competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Lab. Anal.* **11**: 258-266, 1997.
 90. Masuda, S., Uemoto, S., Hashida, T., Inomata, Y., Tanaka, K. and Inui, K. Effect of intestinal P-glycoprotein on daily tacrolimus trough level in a living-donor small bowel recipient. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**: 98-103, 2000.
 91. Inui, K., Okano, T., Takano, M., Kitazawa, S. and Hori, R. A simple method for the isolation of basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney cortex. Enzyme activities and some properties of glucose transport. *Biochim. Biophys. Acta* **647**: 150-154, 1981.
 92. Okuda, M., Tsuda, K., Masaki, K., Hashimoto, Y. and Inui, K. Cisplatin-induced toxicity in LLC-PK₁ kidney epithelial cells: role of basolateral membrane transport. *Toxicol. Lett.* **106**: 229-235, 1999.
 93. Hoshi, T., Suzuki, Y., Kusachi, T. and Igarashi, Y. Interrelationship between sugar-evoked increases in transmural potential difference and sugar influxes across the mucosal border in the small intestine. *Tohoku J. Exp. Med.* **119**: 201-209, 1976.
 94. Nakashima, E., Tsuji, A., Mizuo, H. and Yamana, T. Kinetics and mechanism of in vitro uptake of amino- β -lactam antibiotics by rat small intestine and relation to the intact-peptide transport system. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 3345-3352, 1984.
 95. Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O. and Hirano, H. Localization of

- Na⁺-dependent active type and erythrocyte/HepG2-type glucose transporters in rat kidney: immunofluorescence and immunogold study. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 287-298, 1991.
96. Kiyozaki, H., Kobayashi, E., Toyama, N. and Miyata, M. Segmental small bowel transplantation in the rat: comparison of lipid absorption between jejunal and ileal grafts. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **20**: 67-70, 1996.